



**Departamento de Química Orgánica. Facultad de Química
Instituto de investigaciones Químicas. CSIC - Universidad de Sevilla**

**Glicobióticos: Desarrollo de caramelos con
propiedades funcionales.**

**Loyda Esther Atencio Genes
Sevilla, 2017**



**Departamento
de Química Orgánica**

**Glicobióticos: Desarrollo de caramelos con
propiedades funcionales.**

**Memoria presentada por la
Licenciada Loyda Esther Atencio Genes
para optar al grado de Doctor en Química**

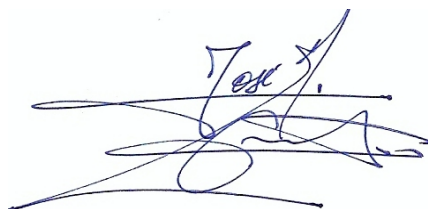
Sevilla, 2017

El presente trabajo ha sido realizado por la Lda. Loyda Esther Atencio Genes en el Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC - Universidad de Sevilla, bajo la dirección de la Dra. Carmen Ortiz Mellet, Catedrática de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla y el Dr. José Manuel García Fernández, Profesor de Investigación del Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC-Universidad de Sevilla).

Los directores del trabajo:



Fdo.: Dra. Carmen Ortiz Mellet



Fdo.: Dr. José Manuel García Fernández

Índice General

Abreviaturas

Relación de figuras, tablas y esquemas

Resumen/Summary

1. Introducción general.....	3
1.1. Alimentos funcionales y nutraceuticos.....	3
1.2. Ecología intestinal.....	8
1.3. Importancia de los prebióticos en los alimentos funcionales: origen, naturaleza química y aplicaciones.....	11
1.4. Oligosacáridos con propiedades prebióticas.....	15
1.4.1. Fructooligosacáridos (FOS).....	15
1.4.2. Inulina y oligofructosa.....	17
1.4.3. Galactooligosacáridos (GOS).....	18
1.4.4. Xilooligosacáridos (XOS).....	19
1.4.5. Isomaltooligosacáridos.....	21
1.4.6. Lactulosa.....	22
1.4.7. Polidextrosa (PDX).....	24
1.5. Dianhidridos de fructosa (DAFs).....	25
1.5.1. Importancia de los DAFs como alimentos funcionales en la nutrición.....	29
1.6. Caramelos: de la química de carbohidratos a la gastronomía molecular y los alimentos funcionales.....	32
1.6.1. Reacciones de caramelización.....	34
1.6.2. Preparación de caramelos enriquecidos en DAFs.....	36
1.6.3. Caramelos enriquecidos en DAFs y sus propiedades	

Prebióticas.....	38
Bibliografía.....	41
2. Objetivos.....	50
3. Reacción de caramelización de Palatinosa® empleando catalizadores heterogéneos y activación mediante irradiación por microondas.....	54
3.1. La Palatinosa® y los condensados de Palatinosa®	54
3.2. Preparación de dianhidridos de Palatinosa® por activación con fluoruro de hidrógeno.....	59
3.3. Síntesis de dianhidridos de Palatinosa®	62
3.4. Desarrollo de un método analítico para la identificación y cuantificación de dianhidridos de Palatinosa®	77
3.4.1. Separación de azúcares mediante cromatografía de gases.....	77
3.4.2. Parámetros cromatográficos.....	78
3.4.3. Determinación de los tiempos de retención y factores de respuesta para patrones puros de Palatinosa®	78
3.5. Caramelización de la Palatinosa® empleando catalizadores heterogéneos y activación mediante irradiación por microondas.....	81
3.5.1. Caramelización de la Palatinosa® empleando resina Lewatit S2328 (H ⁺).....	82
3.5.2. Caramelización de la Palatinosa® usando zeolita como catalizador.....	91
3.5.3. Caramelización de la Palatinosa® con sílica H ₂ SO ₄ ·SiO ₂ (SAS).....	98
3.5.4. Caramelización de la Palatinosa® con sílica H ₃ PO ₄ ·SiO ₂ (SAF).....	101

3.5.5.	Caramelización de la Palatinosa® por activación mediante irradiación por microondas.....	103
3.5.6.	Caramelización de la Palatinosa® con ácido cítrico a presión reducida.....	107
3.6.	Aplicación de la cromatografía de intercambio iónico de alta resolución al análisis de azúcares.....	110
	Bibliografía.....	118
4.	Reacción de caramelización de D-fructosa, D-glucosa y D-manosa empleando catalizadores heterogéneos.....	122
4.1.	Caramelización de D-fructosa utilizando sílicas modificadas.....	122
4.1.1.	Reacciones de caramelización de D-fructosa empleando H ₂ SO ₄ ·SiO ₂ (SAS)...	123
4.1.2.	Reacciones de caramelización D-fructosa empleando H ₃ PO ₄ ·SiO ₄ (SAF).....	128
4.2.	Caramelización de D-glucosa ulizando sílicas modificadas.....	132
4.2.1	Reacciones de caramelización de D-glucosa empleando H ₂ SO ₄ SiO ₂ (SAS).....	134
4.2.2.	Reacciones de caramelización de D-glucosa empleando H ₃ PO ₄ SiO ₂ (SAF)....	137
4.3.	Caramelización de la D-manosa empleando resina de intercambio iónico y sílicas ácidas modificadas.....	139
4.3.1.	Reacciones de caramelización de D-manosa con resina Lewatit® S2328 (H+)...	143
4.3.2.	Reacciones de caramelización de D-manosa con H ₂ SO ₄ SiO ₂ (SAS).....	146
4.3.3.	Reacciones de caramelización de D-manosa con H ₃ PO ₄ SiO ₂ (SAF).....	149
	Bibliografía.....	154
5.	Preparación de caramelos prebióticos a partir de D-fructosa y Palatinosa® utilizando CO₂ como catalizador.....	158

5.1.	Caramelización de la D-Fructosa promovida por CO ₂	159
5.2.	Caramelización de la Palatinosa [®] promovida por CO ₂	167
	Bibliografía.....	172
6.	Conclusiones.....	176
7.	Parte experimental.....	182
7.1.	Métodos Generales.....	182
7.2.	Preparación de dianhidridos de Palatinosa [®] y caramelos enriquecidos en dianhidridos de Palatinosa [®]	197
7.2.1.	Preparación de dianhidridos de Palatinosa [®] mediante activación con poli(fluoruro de hidrógeno) piridinio.....	197
7.2.2.	Separación del dianhidrido de Palatinosa [®] α f, β f 1,2':2,1' (5) de la mezcla obtenida por reacción con HF-Py.....	198
7.2.3.	Preparación de derivados acetalados de Palatinosa (13-18).....	199
7.2.4.	Síntesis estereoselectiva de dianhidridos de Palatinosa [®]	204
7.2.5.	Preparación de 5- α -D-glucopiranosiloximetilfurfural (G-HMF, 23).....	209
7.2.6.	Reacciones de caramelización de Palatinosa [®] empleando catalizadores heterogéneos.....	209
7.2.7.	Reacciones de caramelización de D-fructosa y D-glucosa empleando catalizadores heterogéneos.....	210
7.2.8.	Reacciones de caramelizaciones de D-manosa empleando resina Lewatit S2328 [®] (H ⁺) o silicas ácidas H ₂ SO ₄ ·SiO ₂ (SAS) y H ₃ PO ₄ ·SiO ₂ (SAF).....	212
7.2.9.	Reacciones de caramelización de D-fructosa empleando CO ₂ o CO ₂	

y ácido cítrico como catalizadores.....	213
7.2.10. Reacciones de caramelización de Palatinosa® empleando CO ₂ como catalizador.....	214
7.2.11. Reacciones de caramelización de Palatinosa® empleando catalizadores heterogéneos y activación mediante irradiación por microondas.....	215
7.2.12 Reacciones de caramelización de Palatinosa® con ácido cítrico a presión reducida.....	216
Bibliografía.....	217

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

En este apartado se detallan las abreviaturas y acrónimos utilizados en esta Tesis, así como sus correspondientes significados.

A

Ac	Acetilo
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AF	Alimento Funcional

B

Bn	Bencilo
BnBr	Bromuro de bencilo
Bz	Benzoilo

C

°C	Grado Centígrado
c.c.f.	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

CG-FID	Cromatografo de gases con detector de llamas
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
col.	Colaboradores

D

DAFs	Dianhidridos de fructosa
DCM	Diclorometano
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida

E

e.g.	por ejemplo
EM(ESI)	Espectrometría de masas (ionización por electrospray)
Et ₂ O	Dimetil éter
EtOH	Etanol

F

FOS	Fructooligosacáridos o oligofructosa
FOS cc	Fructooligosacáridos de cadena corta

G

GeOS	Gentiooligosacáridos
GOS	Galactooligosacáridos

H

HPAEC-PAD	Cromatografía líquida de intercambio aniónico con detección amperométrica de pulsos
HF	Fluoruro de Hidrógeno anhidro
HF-py	poli(fluoruro de hidrogeno)piridinio
HMDS	Hexametildisilazano
HMF	5-hidroximetilfurfural
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Coherent experiment</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>

I

IBD	Enfermedades inflamatorias intestinales (<i>Inflammatory bowel disease</i>)
IFTasa	Inulin fructosiltransferasa
IMOs	Isomaltooligosacáridos

M

MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization...
Me	Metilo
MeOH	Metanol
MOS	maltooligosacáridos
m/z	Relación masa/carga

N

NDO Oligosacáridos no digeribles (*non-digerible oligosaccharides*)

P

Ppm partes por millón

py Piridina

R

Rend. Rendimiento

RMN Resonancia Magnética Nuclear

r.p.m. revoluciones por minuto

S

SBA Ácidos biliares recundarios (*Secondary bile acids*)

SCFA Ácidos grasos de cadena corta (*Short-chain fatty acids*)

SOS Sojaoligosacáridos

STOC *Sucrose termal oligosaccharides*

T

t.a. Temperatura ambiente

TfOH Ácido trifluorometanosulfónico

TMCS	Trimetilclorosilano
TMS	Trimetilsililo
TNBS	Acido trinitrobencenosulfónico
TOS	Transgalactooligosacáridos

U

UV	Ultravioleta
----	--------------

X

XOS	Xilooligosacáridos
-----	--------------------

Abreviaturas para RMN

δ	Desplazamiento químico en partes por millón
ppm	Partes por millón
s	Singulete
d	Doblete
t	Triplete
c	Cuartete
q	Quintuplete
m	Multiplete
a	Ancho
$^nJ_{AB}$	Constante de acoplamiento (en Hz) entre los núcleos A y B

separados por n enlaces.

Hz

Hercios

Cq

Átomo de carbono cuaternario

Relación de Figuras de la Tesis

Capítulo 1

Figura 1.1. Distribución y composición de las diferentes especies bacterianas en el tracto gastrointestinal.

Figura 1.2. Clasificación de la flora bacteriana en función de sus efectos beneficiosos y perjudiciales sobre la salud.

Figura 1.3. Estructura química de los fructooligosacáridos (FOS).

Figura 1.4. Estructura química de la inulina y de la oligofructosa.

Figura 1.5. Estructura química de los galactooligosacáridos (GOS).

Figura 1.6. Estructura química de los xilooligosacáridos (XOS).

Figura 1.7. Estructura química de los isomaltooligosacáridos (IMOs).

Figura 1.8. Estructura química de la lactulosa.

Figura 1.9. Estructura química de la polidextrosa.

Figura 10. Estructuras tricíclicas generales de los dianhidridos de di-D-fructosa (DAFs). En rojo se representan los esqueletos de tipo diespiráricos y en azul los de tipo monoespiránico.

Figura 1.11. Estructuras de DAFs aislados de microorganismos y plantas superiores.

Figura 1.12. Estructura química de los 13 dianhidridos de di-D-fructosa (DAFs; **1-7** y **9-14**) y del dianhidrido mixto de fructosa y glucosa (**8**) identificados en el caramelo de sacarosa.

Figura 1.13. Secciones histológicas de mucosa del colon en ratas. No colítico (a). Control TNBS (b). Colon de ratas tratadas con caramelo enriquecido con DAFs (c) o FOS (d), mostrando la mejora en el proceso inflamatorio y la “restauración” del tejido de la mucosa, con la presencia de colonocitos.

Capítulo 3

Figura 3.1. Espectro de ^{13}C RMN (125.7 MHz, D_2O) de la mezcla de reacción de la Palatinosa[®] a 20°C con HF-piridina (7:3) durante 60 min.

Figura 3.2. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl_3) de **11**.

Figura 3.3. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, D_2O) de **13**.

Figura 3.4. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, D_2O) de **17**.

Figura 3.5. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl_3) de **15**.

Figura 3.6. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl_3) de **16**.

Figura 3.7. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl_3) de **19**.

Figura 3.8. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl_3) de **20**.

Figura 3.9. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl_3) de **21**.

Figura 3.10. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl_3) de **22**.

Figura 3.11. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, D_2O) de **23**.

Figura 3.12. Equipo empleado para el análisis de caramelos mediante GC-FID.

Figura 3.13. Rampa de temperatura empleada en el análisis por GC-FID de glicosil-DAFs.

Figura 3.14. Cromatograma de gases del producto obtenido por tratamiento de Palatinosa[®] con HF-piridina (7:3) a 20 °C durante 60 min.

Figura 3.15. Cromatogramas GC-FID y rectas de calibrado correspondientes al análisis de la Palatinosa[®] (a) y del compuesto **5** (b).

Figura 3.16. Reactor utilizado para la caramelización de Palatinosa[®] en condiciones heterogéneas.

Figura 3.17. Muestras de la cinética del caramelo de Palatinosa[®].

Figura 3.18. Estructura de la resina ácida de intercambio iónico Lewatit S2328 (H^+).

Figura 3.19. Cromatograma GC-FID del caramelo de Palatinosa[®] (80%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit S2328 (H^+) (20%) durante 60 min.

Figura 3.20. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] al 80% (a) y 90% (b) a 90 °C, en presencia resina Lewatit S2328 (H⁺) (20%). Región de los dianhidridos de Palatinosa[®] a 30, 60, 90 y 120 min (a) y 10, 30, 45 y 60 min (b).

Figura 3.21. Variaciones de las proporciones de Palatinosa[®], D-fructosa, D-glucosa, G-HMF, dianhidridos de Palatinosa[®] y oligosacáridos superiores durante la caramelización de Palatinosa[®] al 80%, (a) y 90% (b) a 90°C con resina Lewatit S2328 (H⁺) (20%).

Figura 3.22. Espectro de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa[®] (80%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit[®] S2328 (H⁺) (20%) durante 60 min.

Figura 3.23. Variaciones de las proporciones de dianhidridos de Palatinosa[®] durante la caramelización de Palatinosa[®] al 80%, (a) y al 90% (b) a 90 °C con Lewatit S2328 (H⁺) (20%).

Figura 3.24. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit[®] S2328 (H⁺) (10%). Región de dianhidridos de Palatinosa[®] a 10, 30, 60 y 120 min.

Figura 3.25. Cinética de caramelización de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit[®] S2328 (H⁺) (10%) durante 120 min (a). Variación de las proporciones relativas de G₂-DAFs (b).

Figura 3.26. Espectro de masas ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit[®] S2328 (H⁺) (10%) durante 60 min.

Figura 0.1. Estructura típica de la zeolita tipo faujasita (FAU).

Figura 3.28. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de zeolita FAU 56 (10%) (a) y (20%) (b). Región de los dianhidridos de Palatinosa[®] a 3, 18, 24, 48 h (a) y 1, 2, 3, 6 h (b).

Figura 3.29. Variaciones de las proporciones de Palatinosa[®], D-fructosa, D-glucosa, G-HMF, dianhidridos de Palatinosa[®] y oligosacáridos superiores durante la caramelización de Palatinosa (90%) a 90 °C con zeolita FAU 56 (10%) durante 60 h (a) y (20%) durante 6 h (b).

Figura 3.30. Variaciones de las proporciones de dianhidridos de Palatinosa[®] durante la caramelización de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C con zeolita FAU 56 (10%) (a) y (20%) (b).

Figura 3.31. Cromatogramas GC-FID del caramelo de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C durante 8 h en presencia de zeolita FAU 25 (10%) (a) y (20%) (b).

Figura 3.32 Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®](90%) a 90 °C en presencia de zeolita FAU 25 (20%). Región de los dianhidridos de Palatinosa[®] a 1, 4, 6 y 8 h.

Figura 3.33. Espectro de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de zeolita FAU 25 (20%) durante 8 h.

Figura 3.34. Cinética de caramelización de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de zeolita FAU 25 (20%) durante 8 h (a). Variación de las proporciones relativas de G₂-DAFs (b).

Figura 3.35. Cromatogramas GC-FID del caramelo obtenido a partir de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C durante 8 h en presencia de zeolita FAU 15 (10%) (a) y (20%) (b).

Figura 3.36. Cinética de caramelización de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de zeolita FAU 15 (20%) durante 8 h (a). Variación de las proporciones relativas de G₂-DAFs (b).

Figura 3.37. Cromatogramas GC -FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%). Región de los dianhidridos de Palatinosa[®] a 10, 30, 60 y 120 min.

Figura 3.38. Cinética de caramelización de Palatinosa[®] (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) durante 120 min (a). Variación de las proporciones relativas de G₂-DAFs (b).

Figura 3.39. Espectro de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa[®] (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) durante 60 min.

Figura 3.40. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%). Región de los dianhidridos de Palatinosa[®] a 10, 30, 60 y 120 min.

Figura 3.41. Cinética de caramelización de Palatinosa[®] (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) (a). Variación de las proporciones relativas de G₂-DAFs (b).

Figura 3.42. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (80%) en presencia de resina Lewatit S2328 (H⁺) (10%) empleando activación por MW a 100W (a) y 200 W (b). Región de los dianhidridos de Palatinosa[®] a 15, 30, 60, 120 y 240 min.

Figura 3.43. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (80%) en presencia de sílica ácida SAS (10%) empleando activación por MW a 200 W. Región de los dianhidridos de Palatinosa[®] a 15, 30 y 60 min.

Figura 3.44. Variaciones de las proporciones relativas de Palatinosa[®], dianhidridos de Palatinosa[®], G-HMF y oligosacáridos superiores durante la caramelización de Palatinosa[®] (80%) en presencia de resina Lewatit S2328 (H⁺) (10%) empleando activación por MW 100W (a) y 200 W (b).

Figura 3.45 Variaciones de las proporciones de dianhidridos de Palatinosa[®] durante la caramelización de Palatinosa[®] (80%) en presencia de resina Lewatit S2328 (H⁺) (10%) empleando activación por MW a 100W (a) y 200 W (b).

Figura 3.46. Espectro de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa[®] (80%) mediante activación por MW a 200W en presencia de resina Lewatit S2328 (H⁺) (10%) (a) y sílica ácida SAS (10%) (b).

Figura 3.47. Cromatograma GC-FID de la caramelización de Palatinosa[®] (5 g en 1.5 mL) a 135 °C en presencia de ácido cítrico (0,15 g) a presión reducida durante 30 min.

Figura 3.48. Variaciones de las proporciones de dianhidridos de Palatinosa[®] en la caramelización de Palatinosa[®] (5 g en 1.5 mL) a 135 °C durante 30 min en presencia de ácido cítrico (0,15 g) y resina Lewatit S2328 (H⁺) (10%) a presión reducida.

Figura 3.49. Espectro de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa[®] (5 g en 1.5 mL) a 135 °C con ácido cítrico (0,15g) durante 30 min a presión reducida.

Figura 3.50. Equipo empleado para el análisis de los caramelos mediante HPAEC-PAD.

Figura 3.51. Rectas de calibrado correspondientes al análisis mediante HPAEC-PAD de la Palatinosa[®] (a) y del dianhidrido de Palatinosa[®] (5) (b).

Figura 3.52. Rectas de calibrado correspondientes al análisis mediante HPAEC-PAD de la Palatinosa[®] (a) y del dianhidrido de palatinosa (5) (b).

Figura 3.53. Cromatogramas HPAEC-PAD del producto obtenido por tratamiento de Palatinosa[®] con HF-piridina (7:3) a 20 °C durante 60 min (crudo de reacción).

Figura 3.54. Cromatogramas HPAEC-PAD del producto obtenido por tratamiento de Palatinosa[®] (80%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit[®] S2328 (H⁺) (20%) durante 30 min (a) y 120 min (b).

Figura 3.55. Cromatogramas HPAEC-PAD del producto obtenido por tratamiento de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit[®] S2328 (H⁺) (20%,) durante 30 min (a) y 120 min (b).

Capítulo 4

Figura 4.1. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-fructosa (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%). Región de dianhidridos de di-D-fructosa a 10, 30, 60 y 120 min.

Figura 4.2. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia sílica ácida SAS (5%) (a) y (10%) (b). Región de dianhidridos de di-D-fructosa a 10, 60 y 180 min.

Figura 4.3. Variaciones de las proporciones relativas de D-fructosa, DAFs y oligosacáridos superiores durante la caramelización de D-fructosa (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) (a) y la caramelización de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (5%) (b), (10%) (c) y (20%) (d).

Figura 4.4. Espectros de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (5%) tras 60 min.

Figura 4.5. Variaciones de las proporciones relativas de DAFs durante la caramelización de D-fructosa (80%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) (a) y la

caramelización de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (5%) (b), (10%) (c) y (20%) (d).

Figura 4.6. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-fructosa (80%) a 90 °C en presencia sílica ácida SAF (10%). Región de dianhidridos de di-D-fructosa a 30 minutos, 90 minutos, 3 h y 24 h.

Figura 4.7. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia sílica ácida SAF (10%) (a) y (20%) (b). Región de dianhidridos de di-D-fructosa a 10, 60, 90 y 180 min.

Figura 4.8. Variaciones de las proporciones relativas de D-fructosa, DAFs y oligosacáridos superiores durante la caramelización de D-fructosa (80%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) (a) y la caramelización de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) (b) y (20%) (c).

Figura 4.9. Espectros de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) tras 180 min (F_n indica unidades de fructosilo en glicosil-DAFs o en fructooligosacáridos).

Figura 4.10. Variaciones de las proporciones relativas de DAFs durante la caramelización de D-fructosa (80%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) (a) y la caramelización de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) (b) y (20%) (c).

Figura 4.11. Estructura de los disacáridos de D-glucosa disponibles como patrones.

Figura 4.12. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-glucosa (83%) a 90 °C en presencia sílica ácida SAS (10%) (a) y (20%) (b). Región de disacáridos de D-glucosa a 10, 60, 90 y 180 min.

Figura 4.13. Variaciones de las proporciones relativas de D-glucosa, disacáridos y oligosacáridos superiores durante la caramelización de D-glucosa (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) (a) y la caramelización de D-glucosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) (b) y (20%) (c).

Figura 4.14. Espectros de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de una disolución de D-glucosa (83%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) tras 20 min (a) y 180 min (b).

Figura 4.15. Variaciones de las proporciones relativas de los glucodisacáridos durante la caramelización de D-glucosa (80%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) (a) y la caramelización de D-glucosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (5%) (b), (10%) (c) y (20%) (d).

Figura 4.16. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-glucosa (83%) a 90 °C en presencia sílica ácida SAF (20%). Región de disacáridos de D-glucosa a 1, 5, 10 y 28 h.

Figura 4.17. Variaciones de las proporciones relativas de D-glucosa, disacáridos y oligosacaridos superiores durante la caramelización de D-glucosa (80%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) (a) y (20%) (b).

Figura 4.18. Variaciones de las proporciones relativas de los glucodisacáridos durante la caramelización de D-glucosa (80%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) (a) y (20%) (b).

Figura 4.19. Espectros de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de una disolución de glucosa al 83% empleando un 20% $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ como catalizador, tras 60 min.

Figura 4.20. Estructura de los patrones di- y trisacáridicos de manosa utilizados en este estudio.

Figura 4.21. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia resina Lewatit® S2328 (H^+) (10%). Región de disacáridos de D-manosa a 15, 60, 90 y 180 min.

Figura 4.22. Variaciones de las proporciones relativas de D- manosa, disacáridos de manosa y oligosacaridos superiores durante la caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C empleando resina ácida Lewatit S2328 (H^+) (10%) durante 180 min.

Figura 4.23. Espectros de masas en modo MALDI del caramelo obtenido a partir de D-manosa (90%) a 90 °C en presencia de resina ácida Lewatit S2328 (H^+) (10%) tras 15 min (a) y 105 min (b).

Figura 4.24. Variaciones de las proporciones relativas de disacáridos de D-manosa durante la caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia de resina ácida Lewatit S2328 (H^+)(10%).

Figura 4.25. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia sílica ácida SAS (10%). Región de disacáridos de D-manosa a 15, 60, 90 y 180 min.

Figura 4.26. Variaciones de las proporciones relativas de D-manosa, disacáridos de manosa y oligosacáridos superiores durante la caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%).

Figura 4.27. Espectros de masas en modo MALDI del caramelo obtenido a partir de D-manosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) tras 15 min (a) y 240 min (b).

Figura 4.28. Variaciones de las proporciones relativas de disacáridos de D-manosa durante la caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%).

Figura 4.29. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia sílica ácida SAF (10%). Región de disacáridos de D-manosa a 15, 60, 90 y 180 min.

Figura 4.30. Variaciones de las proporciones relativas de D-manosa, disacáridos de manosa y oligosacáridos superiores durante la caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%).

Figura 4.31. Espectros de masas en modo MALDI del caramelo obtenido a partir de una disolución de D-manosa (90%) a 90 °C en presencia de silica ácida SAF (10%) tras 180 min.

Figura 4.32. Variaciones de las proporciones relativas de disacáridos de D-manosa durante la caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en sílica ácida SAF (10%).

Capítulo 5

Figura 5.1. Abundancia relativa (a) y variación de la proporción relativa (b) de los dianhidridos de di- D-fructosa DAF 9 y DAF 10 durante la caramelización de D-fructosa (85%) a 90 °C empleando CO₂ (20 bares).

Figura 5.2. Conversión y proporciones relativas de los diferentes dianhidridos de di-D-fructosa durante la caramelización de la D-fructosa (85%) a 90 °C empleando CO₂ (20 y 1,2 bares) tras 72 h.

Figura 5.3. Cromatograma GC-FID del caramelo de D-fructosa (85%) a 100 °C, empleando CO₂ (20 bares) durante 48 h (a) y variación de las proporciones relativas de los diferentes dianhidridos de di-D-fructosa (b).

Figura 5.4. Variaciones de las proporciones relativas de dianhidridos di-D-fructosa durante la caramelización de D-fructosa (85%) a 100 °C empleando CO₂ (20 bares) a diferentes escalas durante 48 h.

Figura 5.5. Espectro de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de D-fructosa (85%) a 100°C empleando CO₂ (20 bares) durante 48 h.

Figura 5.6. Variación de la conversión y proporciones relativas de los dianhidridos de di-D-fructosa durante la caramelización de la D-fructosa (85%) a 100 °C empleando CO₂ y N₂ durante 48 h.

Figura 5.7. Cromatogramas GC-FID) del caramelo de fructosa (85%) a 90 °C empleando CO₂ (20 bares) y ácido cítrico (5%) (a) y (10%) (b) durante 12h.

Figura 5.8. Variación de las proporciones de los dianhidridos de di-D-fructosa durante la caramelización de la D-fructosa (85%) a 90 °C empleando CO₂ (20 bares) y ácido (5% y 10%), durante 12 h.

Figura 5.9. Variación de las proporciones de los dianhidridos de di-D-fructosa durante la caramelización de la D-fructosa (85%) a 100 °C empleando CO₂ (20 bares) durante 48 h.

Figura 5.10. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (85%) a 90 °C empleando CO₂ (20 bares) durante 24 h (a) y 72 h (b).

Figura 5.11. Variación de las proporciones de los dianhidridos de Palatinosa[®] durante la caramelización de la Palatinosa[®] (85%) a 90 °C empleando CO₂ (20 bares) durante 24 y 72 h.

Figura 5.12 Espectros de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa[®] (85%) a 110 °C con CO₂ (20 bares) durante 24 h.

Figura 5.13. Cromatogramas GC-FID de la caramelización de Palatinosa[®] (85%) a 110 °C empleando CO₂ (20 bares) durante 24 h.

Figura 5.14. Variaciones de las proporciones de los dianhidridos de Palatinosa[®] durante la caramelización de Palatinosa[®] (85%) empleando CO₂ (20 bares) a 90 °C y 24 h (a), 90 °C y 72 h (b) y 110 °C y 24 h (c).

Capítulo 7

Figura 7.1. Reacciones de derivatización de oximación-acetilación de la D-manosa.

Figura 7.2. Cromatogramas GC-FID y rectas de calibrado correspondientes a los patrones de maltosa (a), isomaltosa (b), gentiobiosa (c) y trehalosa (d).

Figura 7.3. Cromatogramas GC-FID y rectas de calibrado correspondientes a los patrones de D-manosa (a) y de los manodisacáridos α -Manp(1→2)Manp (b), α -Manp(1→3)Manp (c) y α -Manp(1→6)Manp (d).

Figura 7.4. Diagrama de evolución del método optimizado para el HPAEC-PAD.

Relación de Tablas de la Tesis

Capítulo 1

Tabla 1.1. Composición química y características de carbohidratos prebióticos.

Tabla 1.2. Oligosacáridos no digeribles con propiedades bifidogénicas comercialmente asequibles.

Capítulo 3

Tabla 3.1. Composición de la mezcla de dianhidridos de Palatinosa[®] obtenida por reacción con HF-Piridina.

Tabla 3.2 Factores de respuesta (K_r) para la D-fructosa, D-glucosa, Palatinosa[®], G-HMF y los dianhidridos de Palatinosa[®] **3** y **5**.

Tabla 3.3. Valores de pKa de algunos azúcares.

Tabla 3.4. Ecuaciones derivadas de las rectas de calibrado de la Palatinosa[®] y del dianhidrido de Palatinosa[®] (**5**) mediante HPAEC-PAD.

Capítulo 4

Tabla 4.1. Tiempos de retención (min) y factores de respuesta (K_r) para la d-glucosa y los glucodisacáridos patrones en la cromatografía GC-FID.

Tabla 4.2 Tiempos de retención (min) y factores de respuesta (K_r) para la D-manosa y los manodisacáridos y manotrisacáridos patrones en la cromatografía (GC-FID).

Capítulo 5

Tabla 5.1. Composición final del producto obtenido por la reacción de caramelización, empleando D-fructosa (85% p/v), en combinación con ácido cítrico y CO₂ (20 bar).

Capítulo 7

Tabla 7.1. Tiempos de retención (min) y factores de respuesta (K_r) para la D-glucosa y los glucodisacáridos patrones en la cromatografía (GC-FID).

Tabla 7.2. Tiempos de retención (min) y factores de respuesta (K_r) para la D-manosa y los manodisacáridos y manotrisacáridos patrones en la cromatografía (GC-FID)

Tabla 7.3. Composición de la mezcla de dianhidridos de Palatinosa[®] obtenida por reacción (7:3) con HF-Piridina.

Tabla 7.4. Condiciones de caramelización de Palatinosa[®], con diferentes catalizadores (escala 5-10 g).

Tabla 7.5a. Condiciones de caramelización de D-fructosa con diferentes catalizadores heterogéneos (Escala pequeña 5-10 y escala superior 300-400 g).

Tabla 7.5b. Condiciones de caramelización de D-glucosa con diferentes catalizadores heterogéneos (Escala pequeña 5-10 y escala superior 300-400 g).

Tabla 7.6. Condiciones de caramelización de D-manosa con diferentes catalizadores heterogéneos (Escala pequeña 5-10 g).

Tabla 7.7. Condiciones de caramelización de D-fructosa empleando CO₂ como catalizador.

Tabla 7.8. Condiciones de caramelización de Palatinosa[®] (85% p/v) empleando CO₂ (20 bar) como catalizador.

Tabla 7.9. Condiciones de caramelización de Palatinosa[®] empleando resina Lewatit S2328 (H⁺) y activación mediante irradiación por microondas.

Relación de Esquemas de la Tesis

Capítulo 1

Esquema 1.1. Mecanismo general de caramelización de la sacarosa por tratamiento térmico y ácido.

Esquema 1.2. Productos formados por la acción del complejo HF-piridina (7:3) sobre la Palatinosa[®] durante 1h a 20 °C.

Capítulo 3

Esquema 3.1. Estructura de los condensados de Palatinosa[®] preparados mediante pirólisis con ácido cítrico.

Esquema 3.2. Productos formados por la acción del complejo HF-piridina (7:3) sobre la Palatinosa[®] durante 1h a 20 °C.

Esquema 3.3. Preparación del compuesto acetilado **11** (α f, β f 1,2':2,1').

Esquema 3.4. Síntesis de derivados acetalados de Palatinosa[®]. Reactivos y condiciones: **13/17**, dimetoxipropano, SnCl₂, dioxano, t.a., 24 h, 61-24%; **14**, Piridina-Ac₂O, t.a., 24 h, 89%; **15**, BzCl-Py, t.a., 18 h, DCM, 65%; **16**, NaH, BrBn, DMF, t.a., 3 h, 66%.

Esquema 3.5. Síntesis estereoselectiva de dianhidridos de Palatinosa[®] a partir de 3,4,2',3',4',6'-hexa-*O*-benzoil/bencil-1,2-*O*-isopropiliden- β -palatinosa (**15**, **16**).

Esquema 3.6. Preparación del 5- α -D-glucosiloximetilfurfural (G-HMF) a partir de Palatinosa[®]

Esquema 3.7. Reacciones de derivatización de la D-fructosa mediante oximación-sililación.

Capítulo 7

Esquema 7.1. Productos formados por la acción del complejo HF-piridina (7:3) sobre la Palatinosa[®] durante 1h a 20 °C.

La investigación y la innovación en el terreno de los alimentos funcionales es actualmente un pilar esencial de la industria agroalimentaria, como lo demuestra la creciente demanda de estos productos por los consumidores, cada vez más conscientes de su incidencia positiva en la mejora de la calidad de vida y el bienestar. El principio básico es que los alimentos no sólo están destinados a satisfacer el hambre y proporcionar los nutrientes necesarios, sino también a evitar enfermedades relacionadas con la nutrición y mejorar la salud física y mental. La sensibilización de los consumidores, en combinación con los avances en diversos campos científicos, proporciona oportunidades únicas para desarrollar una serie de nuevos conceptos relacionados con los alimentos funcionales. En este contexto, los oligosacáridos no digeribles con propiedades prebióticas, esto es, capaces de promover el desarrollo de una flora intestinal favorable en el huésped, son especialmente interesantes. Entre estos, los que incorporan la D-fructosa en su estructura, que incluyen la inulina, la oligofructosa o los fructooligosacáridos (FOS), suponen la mayor parte del mercado actual de alimentos funcionales. Más recientemente se han incorporado los dianhidridos de fructosa (DAFs) y sus derivados glicosilados (glicosil-DAFs). Tanto los DAFs como los glicosil-DAFs se originan de manera natural durante la caramelización de la fructosa o de productos que contienen fructosa, por lo que cabe esperar que caramelos enriquecidos en estos componentes se comporten como “caramelos prebióticos”. El desarrollo de metodologías que permitan transformar azúcares comerciales en productos enriquecidos en oligosacáridos con propiedades prebióticas y la caracterización de estos productos constituyen el objetivo central de este trabajo de Tesis.

Una primera parte de esta Tesis Doctoral está consagrada a la preparación de productos enriquecidos en glicosil-DAFs a partir de la 6-*O*- α -D-glucopiranosil-D-fructopiranososa (isomaltulosa, Palatinosa®). Para ello, se ha estudiado la reacción de caramelización en condiciones heterogéneas promovida por la resina Lewatit® S2328 (H⁺) o por sílicas ácidas modificadas con los ácidos sulfúrico (H₂SO₄·SiO₂; SAS) o fosfórico (H₃PO₄·SiO₄; SAF), calentando a temperaturas inferiores a 100 °C o utilizando activación por microondas. Los dímeros pseudotetrasacarídicos que se originarían tras la primera reacción de glicosidación evolucionan preferentemente mediante una segunda reacción de glicosidación intramolecular,

originando dianhidridos de Palatinosa®. El trabajo incluye el desarrollo de métodos de síntesis estereoselectiva de estos dianhidridos de Palatinosa® y la puesta a punto de un protocolo analítico para su cuantificación en los caramelos finales.

El uso de las sílicas modificadas SAS y SAF es un elemento novedoso de este trabajo de Tesis. Adicionalmente, hemos demostrado que su utilización puede extenderse a la preparación de caramelos enriquecidos en DAFs y glicosil-DAFs a partir de D-fructosa y de caramelos enriquecidos en glucooligosacáridos a partir de D-glucosa. Estos estudios se han completado con la preparación de productos enriquecidos en manooligosacáridos a partir de la D-manosa comercial. En este último caso ha sido necesaria la elaboración de un método de análisis que permitiera separar y cuantificar los manodisacáridos presentes en la fracción disacarídica, lo que nos ha permitido seguir la cinética de la caramelización.

Por último, en la Tesis se ha explorado una nueva tecnología para la preparación de productos enriquecidos en DAFs y glicosil-DAFs, a partir de la D-fructosa y la Palatinosa® utilizando ácido carbónico, formado a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua, como catalizador para promover las reacciones de caramelización en condiciones homogéneas. Aunque la cinética de caramelización es sensiblemente más lenta que en condiciones heterogéneas, la ausencia de contaminantes y el hecho de evitar cualquier manipulación del producto final representan ventajas importantes para un posible desarrollo comercial.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL



1. Introducción general

1.1. Alimentos funcionales y nutraceuticos

El desarrollo de los alimentos funcionales ha representado una revolución en el campo de la investigación y la innovación. El principio básico es que los alimentos no sólo están destinados a satisfacer el hambre y proporcionar los nutrientes necesarios, sino también a evitar enfermedades, mejorar la salud física y aumentar el bienestar mental.¹⁻² Actualmente los alimentos funcionales forman un pilar esencial de la industria agroalimentaria, como lo demuestra la creciente demanda de estos productos por los consumidores, cada vez más conscientes de su incidencia positiva en la mejora de la calidad de vida.²⁻⁴ Cumplir con las expectativas del consumidor implica asumir el desafío de producir productos que sean agradables al paladar, nutritivos y saludables.⁵

La conexión entre los alimentos y sus propiedades beneficiosas se advirtió desde tiempos antiguos. Hipócrates (460-377 a.C.), padre de la medicina moderna, compartió su sabiduría diciendo: "Que la comida sea tu medicina y la medicina tu alimento". A comienzos del siglo XXI, la ciencia atiende a esta nueva perspectiva y se plantea el estudio de la promoción de la salud a través de la alimentación con horizontes más amplios. La alimentación funcional se plantea como una ciencia que describe la interacción de los alimentos con la salud del individuo, independientemente de su poder nutritivo.

El concepto de alimento funcional (AF) se utilizó por primera vez en Japón en 1984. Actualmente se engloba bajo el nombre de *FOSHU* (Foods for Specified Health Use). El gobierno japonés elaboró documentos sanitarios encaminados a mejorar, con su consumo, la salud de la población.⁶ Después de algunos años, en los Estados Unidos se identificaron los AF con aquellos alimentos que modifican la tendencia del consumidor a padecer una enfermedad, favoreciendo un estado saludable.⁷ En Europa, empezó su desarrollo a partir de un documento de consenso de la Comisión Europea elaborado de forma específica por el grupo de trabajo FUFOSSE (Functional Food Science in Europe),

coordinado por el ISLI (The Internacional Life Sciences Institute) Europeo. La expansión del mercado de los alimentos funcionales se debe principalmente al crecimiento de la conciencia crítica de los consumidores y su preocupación por mejorar la salud personal. Según una encuesta de Euromonitor, Japón es el mayor mercado de alimentos funcionales del mundo, seguido de los EE.UU., mientras que el mercado europeo tiene un menor desarrollo. Estos tres mercados son los dominantes, al contribuir en más del 90% a las ventas totales.⁸⁻⁹

El término “alimento funcional” podría definirse como *"cualquier alimento o ingrediente que puede proporcionar un beneficio para la salud más allá de las funciones tradicionales conocidas hasta ahora"*¹⁰. Los AF surgen como resultado de la investigación sobre la relación entre la nutrición, la satisfacción sensorial y la modulación de los procesos fisiológicos, con el fin de definir los productos alimenticios enriquecidos en componentes especiales que ejercen una función positiva.¹¹⁻¹²

La elaboración de los AF se rige por:

.- el Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 Noviembre de 2015, relativo a los nuevos alimentos,

.- el Reglamento (CE) No 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo Europeo de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y propiedades saludables en los alimentos, y

.- el Reglamento (UE) No 432/2012 de la Comisión Europea de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. Estos reglamentos establecen normas sobre las declaraciones que se pueden hacer acerca de las propiedades nutritivas y saludables de los alimentos.

Un AF puede serlo para toda la población o sólo para un grupo específico, definido por sus características genéticas, sexo, edad o por otros factores. Según la concepción

europea, un AF debe seguir siendo en todo momento un alimento con efectos beneficiosos consumido como tal, dentro de una dieta convencional y en la cantidad en que habitualmente es ingerido. Esta perspectiva no incluye los nutraceúticos o farmacoalimentos.¹³ El término nutraceútico se introdujo para el caso particular de los ingredientes alimentarios que han demostrado un efecto beneficioso directo sobre la salud humana.¹⁴ La visión europea es diferente de la norteamericana, porque considera que los AF son componentes habituales de la dieta que ejercen sus efectos en cantidades consumidas normalmente en una dieta equilibrada, y se excluye como tales a las píldoras, y cápsulas¹⁵

Los AF producen beneficios terapéuticos y preventivos, mejorando múltiples funciones básicas en el organismo, en especial las gastrointestinales, cardiovasculares e inmunológicas. Generalmente potencian el desarrollo y la diferenciación celular, modulan el metabolismo de nutrientes y la expresión génica, disminuyen el estrés oxidativo y tienen efectos positivos en la esfera psíquica y el desarrollo fetal. Entre las patologías cuyo desarrollo puede evitarse o reducirse mediante el consumo de AF están las enfermedades crónicas, la obesidad, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (ECV), así como enfermedades neurológicas y el cáncer.^{13, 16}

A día de hoy los AF se han incorporado en prácticamente todas las categorías de alimentos. Desde el punto de vista del producto pueden establecerse diferentes clasificaciones,^{3,17,18} tales como:

Productos enriquecidos: son alimentos con nuevos nutrientes o componentes añadidos que no se encuentran de manera natural en los mismos. Por ejemplo, zumos de frutas enriquecidos con vitamina C, vitamina E, ácido fólico, zinc y calcio, probióticos o prebióticos.

Productos Alterados: son alimentos en los que algún componente nocivo ha sido eliminado, reducido o sustituido por otra sustancia con efectos beneficiosos. Por ejemplo, carnes o helados en los que se incorporan fibras para sustituir grasas.

Productos mejorados: se trata de productos en los que alguno de los componentes se ha mejorado naturalmente a través de condiciones especiales de cultivo, o una nueva composición de la alimentación, o la manipulación genética, u otra forma diferente de modificación. Por ejemplo, huevos con un mayor contenido de ácidos grasos omega-3 obtenidos por la alimentación de pollos con una dieta modificada o alimentos vegetales en los que se favorece la formación de fitoesteroles o fibra soluble para prevenir enfermedades como el cáncer.¹⁹

Otra clasificación alternativa de alimentos funcionales, en función esta vez de los efectos que producen, es la que propone Makinen-Aakula y colaboradores.²⁰

- Alimentos funcionales que ayudan a regular el estómago y las funciones del colon, tales como los probióticos y prebióticos.
- Alimentos funcionales que contribuyen al bienestar y a la mejora de la capacidad de aprendizaje de los niños.
- Alimentos funcionales que están diseñados para reducir la probabilidad de riesgo para la salud, como el colesterol de alta densidad para prevenir la presión arterial alta.
- Alimentos funcionales que ayudan a facilitar la calidad de vida mediante la dieta, como productos sin lactosa o productos sin gluten.

Los AF tienen componentes con actividad funcional y está demostrado que proporcionan beneficios para la salud. Los principales AF existentes en el mercado son:

- **Los probióticos.** “Contienen microorganismos” que, consumidos en cantidades adecuadas, tienen consecuencias beneficiosas para la salud humana, específicamente para la salud gastrointestinal e inmune y para la prevención del cáncer. Mejoran la nutrición y el equilibrio de la microbiota del tracto intestinal. Los más estudiados son las bacterias ácido-lácticas (LAB) y las bifidobacterias.

- **Los prebióticos.** “Ingredientes alimentarios no digeribles” que afectan beneficiosamente al huésped, mejorando y estimulando el crecimiento y/o la actividad de

una o un número limitado de bacterias en el colon. Los más estudiados son los fructooligosacáridos (FOS), la inulina, los isomaltooligosacaridos (IMOs), la polidextrosa, la lactulosa y los almidones resistentes.²¹

- **Los simbióticos.** Contienen probióticos y prebióticos en una combinación sinérgica, que afecta beneficiosamente al individuo, mediante la mejora de la supervivencia y la persistencia de los suplementos dietéticos microbianos vivos en el intestino. Los más estudiados son los fermentados lácteos que contienen inulina y bifidobacterias.²²

- **Bebidas funcionales.** “Bebidas no alcohólicas enriquecidas con vitaminas A, C y E y otros ingredientes funcionales”; ayudan a reducir el nivel de colesterol, estimulan la función antioxidante y evitan la inhibición del crecimiento y la deformación de los huesos.

- **Alimentos funcionales con proteínas.** Las más estudiadas son las proteínas lácteas o las de soja. Tiene influencia beneficiosa para la obesidad, el tracto gastrointestinal, la osteoporosis y actividades antivirales.

- **Alimentos con lípidos funcionales.** Incluyen los de tipo omega-3 de distinto origen, esteroides y glicéridos modificados.

- **Alimentos funcionales con antioxidantes.** En esta categoría se encuentran los compuestos fenólicos o carotenoides de origen natural. Su influencia beneficiosa para la salud se basa en el mecanismo básico de neutralización de radicales libres. Algunos ejemplos son los fitosteroides, el licopeno, los polifenoles o las isoflavonas, entre otros.

Recientemente, las industrias del sector agroalimentario han desarrollado formulaciones con productos que ofrecen múltiples beneficios para la salud en un solo alimento.²³ Algunos ejemplos los encontramos en la confitería, la panadería, productos farmacéuticos y el mercado de alimentos para bebés.^{3,24}

Tanto en Japón como en Europa el mercado de alimentos funcionales está dominado principalmente por los probióticos. Desde 2005 se han comercializado más de 370 productos con probióticos en todo el mundo.²⁵

Los AF están a la vanguardia de la ciencia de los alimentos y ofrecen una ventana amplia de oportunidades en el ámbito de la industria agroalimentaria.. Se han desarrollado como alimentos de diseño, con propiedades funcionales adicionales a las del alimento original.²⁶⁻²⁷ El hecho de que estén íntimamente relacionados con la función gastrointestinal suscita un especial interés ya que actualmente existe un sector importante de la población afectado por problemas relacionados con la misma²⁸. La sensibilización de los consumidores, en combinación con los avances en diversos campos científicos, proporciona oportunidades únicas para desarrollar una serie de nuevos conceptos relacionados con los alimentos funcionales.²⁹ Esta Tesis Doctoral se centra específicamente en una categoría de alimentos funcionales con propiedades prebióticas.

1.2. Ecología intestinal

Una dieta saludable y equilibrada influye en el potencial genético de un individuo, en el rendimiento general y en la prevención de enfermedades. Los avances de la ciencia y la tecnología de los alimentos están proporcionando métodos cada vez más sofisticados para controlar y alterar la estructura física y la composición química de los productos alimenticios. Una nueva generación de estudios y de herramientas derivadas de las nuevas técnicas, como la biología molecular, han demostrado que los componentes de la dieta, en particular los probióticos, prebióticos y simbióticos, pueden desempeñar un papel importante en la regulación gastrointestinal, en el sistema inmune, en el sistema cardiovascular, en la regulación de la glucosa en sangre, etc. Los probióticos pueden mejorar el equilibrio microbiano intestinal, promoviendo un cambio en la composición de la microbiota colónica. La utilización de bacterias exógenas supone, sin embargo, una limitación. En contraste, se ha demostrado que los prebióticos estimulan el crecimiento de bifidobacterias y otras bacterias beneficiosas endógenas que, después de un período de alimentación corto, se vuelven predominantes en las heces humanas. Por otra parte, estos

prebióticos modulan el metabolismo lipídico, probablemente a través de productos de fermentación.³⁰

La flora microbiana está constituida por bacterias que se encuentran en el tracto gastrointestinal y que varían en su número y composición. (Figura 1.1).

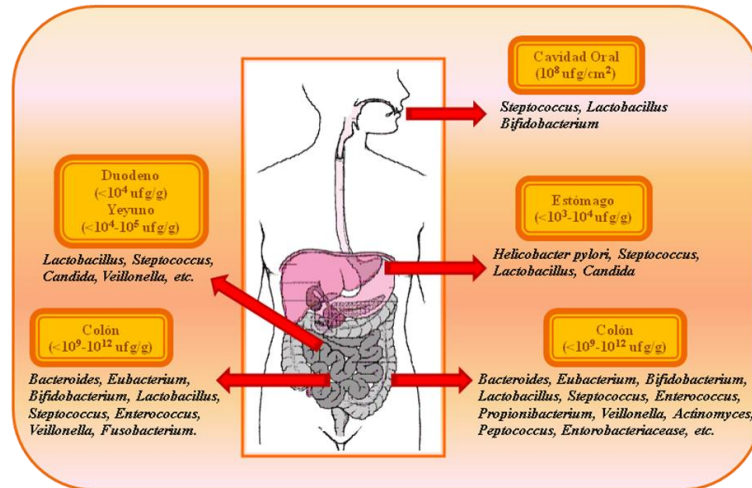


Figura 1.1. Distribución y composición de las diferentes especies bacterianas en el tracto gastrointestinal.

Las bacterias intestinales pueden dividirse en especies que ejercen efectos nocivos y especies que ejercen efectos beneficiosos sobre el individuo. Las primeras pueden producir diarrea, infecciones, daño hepático, carcinogénesis y putrefacción intestinal. Los AF pueden mejorar la salud inhibiendo el crecimiento de bacterias dañinas, estimulando las funciones inmunes, reduciendo los problemas de digestión, mejorando la digestión y la absorción de nutrientes esenciales y la síntesis de vitaminas (Figura 1.2).

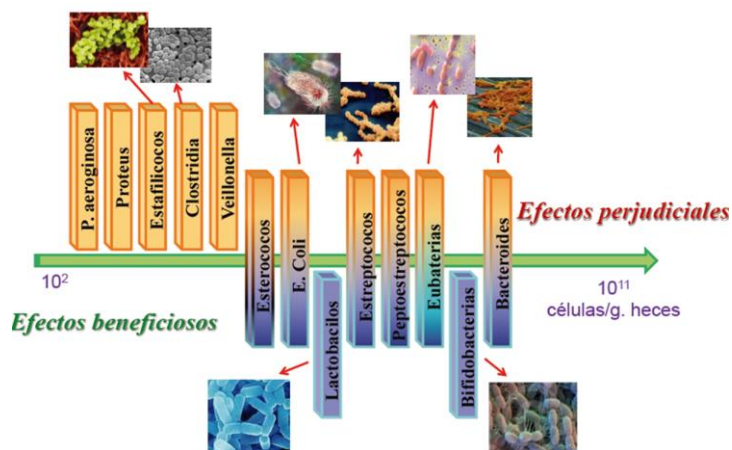


Figura 1.2. Clasificación de la flora bacteriana en función de sus efectos beneficiosos y perjudiciales sobre la salud.

Para el crecimiento bacteriano, los principales sustratos son los carbohidratos de la dieta que han escapado a la digestión en el tracto gastrointestinal superior. Entre 10 y 60 g/día de carbohidratos en la dieta son necesarios para que alcancen el colon. La mayoría de los azúcares y oligosacáridos ingeridos y digeridos por los seres humanos son absorbidos en el intestino delgado. Sin embargo, algunos como la lactosa, la rafinosa, la estaquiosa o los fructooligosacáridos (tales como oligofructosa o inulina) son capaces de alcanzar el colon intacto. Además, muchos aditivos alimentarios como los polioles derivados de azúcar (alditales como el sorbitol y el xilitol) no se absorben.

Además, el anfitrión es capaz de producir, a partir de la dieta, otros carbohidratos fermentables, como las glicoproteínas (mucinas) o el sulfato de condroitina. Entre las especies de bacterias sacarolíticas capaces de crecer en los hidratos de carbono están los géneros *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* y *Clostridium*. Debido a la naturaleza extremadamente compleja del ecosistema intestinal, muchos grupos de bacterias son incapaces de degradar hidratos de carbono polimerizados directamente. Estas especies crecen por alimentación cruzada de fragmentos producidos por microorganismos degradadores de polisacáridos primarios. Las bacterias sacarolíticas

están muy bien adaptadas al crecimiento en un medio rico en los carbohidratos complejos que llegan al colon, gracias a su capacidad para producir una variedad de glicosidasas. . En el colon, las bacterias sacrolíticas fermentan los polisacáridos generando ácidos grasos de cadena corta (*Short Chain Fatty Acids*, SCFAs), CO₂ y H₂, afectando la microbiota colónica.^{30,31}

La producción de ácido grasos de cadena corta es uno de los procesos fisiológicos más importantes mediados por microorganismos del colon.³² En términos cuantitativos, los almidones resistentes y polisacáridos de la pared celular vegetal (celulosas y polisacáridos no celulósicos tales como arabinogalactanos, xilanos, pectinas, gomas y mucílagos) son los principales sustratos de fermentación en el intestino grueso. Factores fisiológicos, nutricionales y microbiológicos pueden afectar las reacciones de fermentación, en particular en el tránsito colónico. Otros factores que influyen en las reacciones metabólicas de la microbiota del individuo son el envejecimiento, la actividad del sistema neuroendocrino, el estrés de páncreas, las secreciones en el tracto digestivo, la producción de moco, el tiempo de tránsito intestinal, las drogas y los antibióticos.³³⁻³⁴

1.3. Importancia de los prebióticos en los alimentos funcionales: origen, naturaleza química y aplicaciones.

Como se ha indicado, los prebióticos pueden ser definidos como ingredientes alimentarios no digeribles que afectan beneficiosamente la salud del consumidor mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias en el colon.^{32, 35-37} Se considera que un compuesto tiene actividad prebiótica cuando llega al colon sin degradarse o alterarse y, una vez allí, se comporta como un sustrato alimenticio que estimula la flora bacteriana saprofita existente.

Los ingredientes alimentarios con características prebióticas generalmente muestran ciertas características únicas, tales como la hidrólisis y absorción limitadas en el tracto gastrointestinal superior, la estimulación selectiva de la multiplicación de las bacterias

beneficiosas en el colon y el potencial para suprimir patógenos y limitar su virulencia mediante procesos tales como la inmunoestimulación y la estimulación de la microflora beneficiosa que aumenta la resistencia a la colonización por patógenos. El consumo de prebióticos se ha asociado con la disminución del riesgo de padecimiento de ciertas enfermedades, tales como la diarrea asociada a infecciones intestinales, la osteoporosis, (al promover la absorción del calcio y, por lo tanto, el aumento de la masa ósea), la obesidad, la diabetes Tipo 2, o el cáncer de colon. Además, el consumo de prebióticos pueden facilitar la neutralización de productos tóxicos, estimular el sistema inmune y prevenir infecciones del sistema urogenital.³⁸

Las investigaciones sobre los prebióticos, especialmente de aquellos que tienen un potencial nutraceútico adicional (esto es, potencial curativo sobre patologías ya existentes), se han intensificado en los últimos 15 años.³⁹⁻⁴⁰ Cualquier alimento que llega al colon (por ejemplo, los hidratos de carbono no digeribles, algunos péptidos y ciertos lípidos) puede, en principio, actuar como prebiótico.⁴¹ Los oligosacáridos son candidatos especialmente interesantes, ya que la mayoría no son sensibles al ácido gástrico, escapan a la degradación y la adsorción en el tracto gastrointestinal superior y alcanzan el colon intactos,⁴² promoviendo la proliferación de bacterias beneficiosas como las bifidobacterias y los lactobacilos, los cuales constituyen una proporción significativa de la microflora intestinal, aportando efectos beneficiosos en el huésped.⁴³ Durante su fermentación se producen ácidos grasos de cadena corta que afectan directa o indirectamente a la proliferación de enterocitos, la inflamación, la carcinogénesis colorrectal, la disponibilidad de minerales, la colonización por patógenos, la actividad de las enzimas y la producción de metabolitos nitrogenados, teniendo por tanto una incidencia muy importante en la fisiología del colon.^{44,45}

La utilización de los carbohidratos prebióticos como componentes de los alimentos mejoran las características sensoriales y proporcionan una composición nutricional más equilibrada. Los prebióticos proporcionan más frescura en aperitivos y cereales,

prolongando su vida útil en la estantería. También mantienen los panes y tortas húmedas y frescas por largo tiempo. Su solubilidad permite la incorporación en bebidas, tales como productos lácteos y productos para untar, como la mantequilla, quesos, cremas y pastas para untar. La adición de prebióticos permite reemplazar una cantidad considerable de grasa, manteniendo la emulsión y la textura untuosa al mismo tiempo.

La adición de prebióticos a la carne magra, productos cárnicos y productos lácteos (yogurt) producen una sensación en la boca más cremosa y una consistencia más jugosa por la retención de agua. Además, se utilizan prebióticos en formulaciones de productos sin azúcar añadido, como ingredientes de bajo poder calórico y como fibra en el chocolate. En el mercado de productos lácteos, especialmente los yogures con fruta, y en muchas recetas con fruta se ha desarrollado mucho el uso de prebióticos, ya que disminuyen la sensación de sinéresis en la boca.²¹

1.4. Oligosacáridos con propiedades prebióticas

A excepción de la inulina, que es un polisacárido, los oligosacáridos con propiedades prebióticas son hidratos de carbono de cadena corta, constituidos por 3-10 monómeros.⁴⁶ La glucosa, la galactosa, la fructosa y la xilosa son los monosacáridos más comunes presentes en estos oligosacáridos.

En función de sus componentes, los oligosacáridos prebióticos pueden clasificarse en mano-oligosacáridos,⁴⁷ oligosacáridos derivados de pectinas,⁴⁸ isomalto-oligosacáridos (IMOS),⁴⁹ xilo-oligosacáridos (XOS),⁵⁰ galacto-oligosacáridos / oligosacáridos transgalactosilados (GOS / TOS),³⁴ y fructanos como los fructooligosacáridos (FOS), la inulina, o el levano.³⁴ Otros oligosacáridos como los presentes en la soja (*soja oligosaccharides*, SOS),^{36,37,51} la lactulosa, el lactitol, la lactosacarosa y la palatinosa, también presentan características prebióticas.^{21, 52,53}

Los oligosacáridos prebióticos se clasifican teniendo en cuenta su estructura química y grado de polimerización (Tabla 1.1). Otros oligosacáridos que incorporan componentes

monosacáridos diferentes, tales como arabinosa, ramnosa, glucosamina y ácido galacturónico, se encuentran también en estudio. La mayoría son carbohidratos de peso molecular bajo o medio.⁵⁴ En algunos casos, como la inulina, a las propiedades como prebiótico se suman propiedades análogas a las de la fibra dietética constituida por polisacáridos diferentes del almidón, tales como celulosa, dextrinas, pectinas o beta-glucanos, ceras y lignina.^{21, 55-56}

Tabla 1.1. Composición química y características de carbohidratos prebióticos.

Componente	Estructura/Composición	DP*
Xilooligosacáridos	Xilosa con uniones $\beta(1 \rightarrow 4)$	2-4
Oligosacáridos de soja	Mezcla de rafinosa y estaquiosa	2-3
TOS	6'-O-Galactosil-lactosa	2-8
Inulina	$\beta(2 \rightarrow 1)$ fructano	2-65
Fructooligosacáridos	$\beta(2 \rightarrow 1)$ fructano	2-8
Galactooligosacáridos	Oligogalactosa (85%)	--
Isomaltooligosacáridos	Mezcla de oligómeros de glucosa con uniones $\alpha(1 \rightarrow 6)$	2-8
Condensados de Palatinosa	Reorganización enzimática de moléculas de sacarosa	2-7
Lactulosa	Galactosil $\beta(1 \rightarrow 4)$ fructosa	2
*DP = grado de polimerización		

Algunos oligosacáridos prebióticos están constituidos por monosacáridos enlazados mediante uniones de tipo β . El organismo humano carece de los enzimas digestivos necesarios para poder hidrolizar oligosacáridos con estas uniones, puesto que las enzimas α -glucosidasa, maltasa-isomaltasa y sucrasa son específicas de uniones glicosídicas α , lo que garantiza que no sean digeridos antes de alcanzar el colon. En la Tabla 1.2 se muestran, además de los oligosacáridos ya recogidos en la Tabla 1.1, otros oligosacáridos encontrados en la bibliografía científica como candidatos a ejercer un efecto prebiótico.

Tabla 1.2. Oligosacáridos no digeribles con propiedades bifidogénicas comercialmente asequibles.³¹

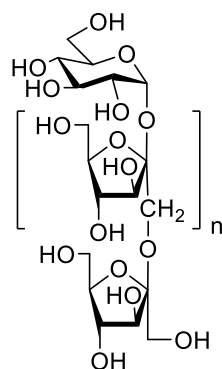
Oligosacárido	Estructura
Ciclodextrinas	(Glc) _n
Fructooligosacáridos	(Fru) _n -Glc
Galactooligosacáridos	(Gal) _n -Glc
Gentiooligosacáridos	(Glc) _n
Glicosilsacarosa	(Glc) _n -Fru
Isomaltoligosacáridos	(Glc) _n
Isomaltulosa (palatinosa)	Glc-Fru
Lactosacarosa	Gal-Glc-Fru
Lactulosa	Gal-Fru
Maltooligosacáridos	(Glc) _n
Rafinosa	Gal-Glc-Fru
Oligosacáridos de soja	(Gal) _n -Glc-Fru
Xilooligosacáridos	(Xil) _n

La estructura y propiedades de algunos de estos carbohidratos con propiedades prebióticas se comentan con más detalle en los apartados que siguen.

1.4.1. Fructooligosacáridos (FOS)

Los fructooligosacáridos (FOS) han sido aislados de plantas y son oligosacáridos que se componen de 3 a 10 unidades de fructofuranosa unidas por enlaces glicosídicos β -(2 \rightarrow 1). En la mayoría de los casos, también incorporan una unidad de glucosa terminal enlazada mediante una unión α -(1 \rightarrow 2) a la fructosa (Figura 1.3.).⁵⁷ Diferentes estudios han demostrado las propiedades funcionales de los FOS, incluyendo la reducción de los

niveles de colesterol y los niveles de glucosa en sangre, la disminución de la presión arterial o la mejora de la absorción de calcio y magnesio.^{58,59} Los FOS no son digeridos en el tracto gastrointestinal humano y alcanzan el colon, donde estimulan de manera beneficiosa el crecimiento y el fortalecimiento de algunas de las bacterias existentes en el intestino de manera específica.³⁰ Gibson y Roberfroid encontraron características bifidogénicas de los FOS en humanos.⁴¹ Los recuentos promedio de bifidobacterias aumentaron tras el consumo de FOS, mientras que hubo una reducción significativa en *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Clostridium sp.* Según los autores, estos compuestos son utilizados mejor por las bifidobacterias, y el crecimiento de estas desfavorece las condiciones para el crecimiento de las bacterias nocivas del colon. El mecanismo por el cual se produce la inhibición de patógenos (exógenos o endógenos) se puede explicar por la disminución del pH en el intestino como consecuencia de la formación de ácidos grasos de cadena corta a partir de la fermentación de los FOS.^{60,61} La disminución en el número de bacterias dañinas (tales como *Escherichia coli*, *Clostridium faecallis*, *Streptococcus* y *Proteus*) tiene como resultado la disminución de metabolitos tóxicos, tales como amoniaco, indoles, fenoles y nitrosaminas.⁶²



FOS
 $n = 1$, 1-Kestosa
 $n = 2$, Nistosa
 $n = 3$, Fructosilnistosa

Figura 1.3. Estructura química de los fructooligosacáridos (FOS).

1.4.2. Inulina y oligofructosa

La inulina es un polímero lineal de D-fructosa con enlaces glicosídicos β -(2 \rightarrow 1). Pertenece, por tanto, al grupo de fructanos, y es el polisacárido de reserva en una variedad de plantas (Figura 1.4).^{61,63} Diversos alimentos, entre ellos algunos ampliamente consumidos como la cebolla, contienen inulina. Se utiliza para enriquecer productos alimenticios junto con la fibra, manteniendo la apariencia y el sabor de las formulaciones.

Se ha demostrado que tanto la inulina como la mezcla de oligómeros más cortos conocida como oligofructosa, actúan como factores bifidogénicos, estimulando el sistema inmune del huésped, disminuyendo los niveles de bacterias patógenas en el intestino, previniendo el estreñimiento y disminuyendo el riesgo de osteoporosis al estimular la absorción de minerales, especialmente calcio.³⁵ Se pueden encontrar en diversos alimentos, incluyendo frutas y vegetales tales como los espárragos, achicoria, la alcachofa de Jerusalén, tomates, maíz, legumbres y trigo.

Los trabajos realizados sobre la inulina en modelos animales experimentales han demostrado que posee propiedades anticancerígenas.⁶⁴ En otro estudio, la incorporación de la inulina y la oligofructosa en la dieta de ratas redujo la carcinogénesis de colon inducida por azoximetano.⁶⁵ El consumo de galletas enriquecidas en inulina por pacientes obesos, con factores de riesgo cardiovascular, no condujo a cambios en los parámetros antropométricos ni efectos adversos gastrointestinales. Por el contrario, la presencia de inulina (3 g) en una galleta enriquecida redujo los niveles de colesterol LDL en los pacientes.⁶⁶

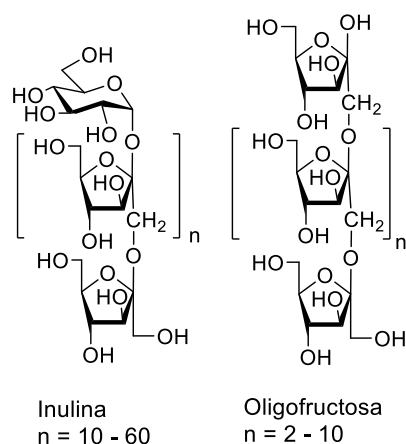


Figura 1.4. Estructura química de la inulina y de la oligofructosa.

1.4.3. Galactooligosacáridos (GOS)

Los galactooligosacáridos (GOS) también se incluyen entre los oligosacáridos no digeribles (*non-digestible oligosaccharides*, NDO). Los GOS están constituidos por residuos de galactosa unidos por enlaces beta, con una unidad de lactosa terminal (Figura 1.5.).⁶⁷ No son metabolizados por el huésped y alcanzan el intestino, donde son metabolizados por las bifidobacterias. Consecuentemente, la ingestión de GOS promueve la proliferación de las bifidobacterias y la reducción de la población de bacterias potencialmente dañinas, lo que causa efectos beneficiosos para la salud humana. Entre estos están la desintoxicación del hígado por la reducción de los metabolitos tóxicos, la prevención de la diarrea patógena gracias a la producción de ácidos grasos de cadena corta por las bifidobacterias, la prevención del estreñimiento, el aumento de la tolerancia a la lactosa, y el aumento de la mineralización ósea y de la resistencia a la fractura causada por la estimulación de la absorción de calcio, lo que podría reducir el riesgo de osteoporosis.⁶⁸ Se han realizado estudios para determinar el efecto de una mezcla de GOS con otros prebióticos, por ejemplo con fructooligosacáridos (FOS) y con inulina.⁶⁹ La combinación inulina/GOS se tradujo en aumento de la población de bifidobacteria en la

flora fecal y produjo una disminución significativa de los episodios de problemas gastrointestinales y de infecciones de las vías respiratorias,^{70,71} además de tener un efecto beneficioso sobre el sistema inmunitario de los lactantes prematuros.⁷²

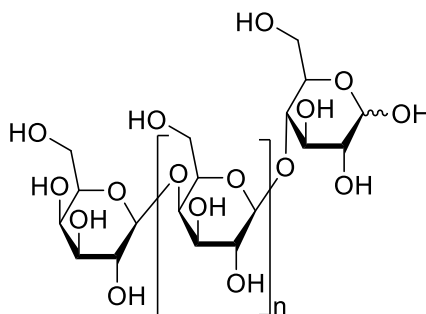


Figura 1.5. Estructura química de los galactooligosacáridos (GOS).

1.4.4. Xilooligosacáridos (XOS)

Los xilooligosacáridos (XOS) son oligómeros de azúcares formados por unidades de xilosa (Figura 1.6.). No son digeribles por los seres humanos y son, por tanto, no calóricos. Se encuentran en las frutas, verduras, leche y miel. La producción industrial de XOS se lleva a cabo a partir de materiales lignocelulósicos (*lignocellulosic materials*; LCMS), obtenidos a partir de una variedad de residuos forestales (madera de eucalipto) o de industrias agrícolas (mazorca de maíz, almendra, aceituna, cáscaras de arroz, avena, cebada).^{73,74,75} Los XOS mejoran la calidad de los alimentos, proporcionando un cambio en las características físico-químicas y de sabor y estimulando la actividad de *Bifidobacterium* en el tracto intestinal.³⁸ Los XOS presentan una serie de características favorables para su uso como ingrediente en productos alimentarios, como son su estabilidad en una amplia gama de pH (2,5 a 8,0) y temperatura, el metabolismo selectivo por bifidobacterias, el aumento de la producción de ácidos grasos volátiles, la reducción de las lesiones de úlcera de estómago⁷⁶ y su olor aceptable.⁷⁷ Su incorporación en alimentos presenta algunas ventajas respecto a la inulina en términos de resistencia a los

ácidos en la calefacción y la resistencia a la degradación en jugos de pH bajos.⁷⁸ El disacárido xilobiosa, que también se considera un xilooligosacárido (con un grado de polimerización de 2; X2),⁷⁹ presenta un 30% del dulzor de la sacarosa.⁸⁰

Los efectos sobre la salud de los xilooligosacáridos se han observado principalmente en la flora intestinal.^{81,46} Los resultados in vivo (utilizando ratas) permitieron determinar un crecimiento considerable de *Bifidobacterium spp* en el tracto gastrointestinal⁸² y un aumento de los ácidos grasos de cadena corta totales en el ciego.^{83,38} Las pruebas en humanos demostraron que la ingestión de XOS beneficia también la flora intestinal. La xilobiosa ingerida (X2) no fue excretada ni en las heces ni en la orina después de 24 horas desde la administración oral. Estos compuestos no son hidrolizados por la saliva, el páncreas ó el jugo gástrico, lo que sugiere que su digestión se realiza exclusivamente por las bacterias intestinales.⁸⁴ La digestibilidad de los XOS en el tracto gastrointestinal y su efecto sobre la absorción de ácidos biliares se ha comparado con los efectos de los FOS y los isomaltooligosacáridos (IMOS). El análisis por HPLC de la hidrólisis de los FOS, IMOS y XOS tras de 4 horas de digestión in vitro indicó que mientras la mayor parte de los IMOS y los FOS fueron digeridos por el jugo intestinal, los XOS no fueron digeridos por ninguna enzima digestiva. El retraso en los efectos de XOS sobre la absorción de ácidos biliares en comparación con IMOS y FOS se confirmó además en experimentos in vitro.⁸⁵ Estos estudios han mostrado que *Bifidobacterium spp.* y *B. adolescentis* son consumidores activos de XOS (X2 y X3). Por otro lado, la ingesta de XOS estimuló la proliferación de *Bifidobacterium bifidum* en el intestino, pero no de *Staphylococcus*, *E. coli* y especies de tipo *Clostridium*. Está ultima no utiliza XOS.^{82,84} Sin embargo, la mayoría de las especies de tipo *Lactobacillus* utilizaron los XOS, incluyendo *L. fermentum*.⁸⁴ Al realizar comparaciones con otros prebióticos en experimentos de crecimiento in vitro, las bacterias *Bifidobacterium spp.* prefirieron los XOS, la rafinosa y los FOS sobre las hexosas. Además, con los XOS la absorción fue más eficaz que con la

rafinosa y los FOS.⁸⁶ Rycroft y col.⁸⁷ evaluaron las propiedades fermentativas de algunos prebióticos y encontraron que XOS y lactulosa producen los mayores incrementos en el número de bifidobacterias, mientras que los FOS favorecieron al desarrollo de lactobacilos. Una mezcla de estos oligosacáridos podría por tanto aumentar la funcionalidad.

En un estudio reciente, Makelainen y col.⁸⁸ analizaron la fermentación de dos xilooligosacáridos derivados de la madera y una preparación comercial de XOS por microbiota normal en un simulador de colon humano (EnteromixR). Los xilooligosacáridos se fermentaron de manera selectiva por las cepas de *Bifidobacterium lactis*. Los XOS fueron más eficientes que los FOS para aumentar el número de *B. lactis* en el modelo de colon, lo que apunta a que la combinación de los XOS y *B. lactis* podría ser una formulación simbiótica específica.

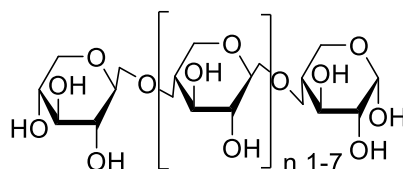


Figura 1.6. Estructura química de los xilooligosacáridos (XOS).

1.4.5. Isomaltooligosacáridos

Los isomaltooligosacáridos (IMOs), tales como isomaltosa, panosa, isomaltotriosa, e isomaltotetraosa tienen enlaces glucosídicos α -(1 \rightarrow 6) y grado de polimerización de 3 a 6 (Figura 1.7.). Los IMOs son producidos de forma natural a partir de la miel y alimentos fermentados, tales como el miso, el sake o la salsa de soja. Estos oligosacáridos también pueden ser producidos por la transglucosidación de los sustratos de enzimas tales como la dextranasa y la dextranucrasa. La transformación de la maltosa en IMOs también puede efectuarse usando enzimas con actividad α -glucosidasa.

Los IMOs no se adecuan completamente a la definición de prebióticos, ya que son parcialmente metabolizados en el intestino delgado humano. Parte del material ingerido

alcanza el colon, donde experimenta un metabolismo selectivo. Los IMOs se fermentan por bifidobacterias y otras especies de géneros intestinales como *Bacteroides* y *Clostridia*. En varios ensayos en humanos el consumo de IMOs dio lugar a aumentos pequeños de la población de bifidobacterias en heces empleando dosis de tan sólo 10-20 g al día.

Las enzimas utilizadas para la preparación industrial de IMOs son producidas por microorganismos como *Penicillium lilacinum*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, etc. Los IMOs disponibles de manera comercial se denominan IMO-900, IMO-800, etc., están constituidos mayoritariamente por oligosacáridos con entre 3 y 6 unidades de glucosa y pueden ser usados para el tratamiento del estreñimiento o la hiperlipidemia, por ejemplo. Las mezclas de IMOs, como IMO-900 producido por Showa Sangyo Co Ltd, son preparadas a partir de almidón de maíz por la acción de la α -amilasa, la pullulanasa, y la α -glucosidasa.^{22,89}

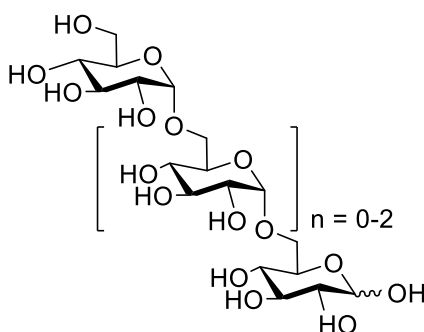


Figura 1.7. Estructura química de los isomaltooligosacáridos (IMOs).

1.4.6. Lactulosa

La lactulosa es un disacárido compuesto de fructosa y galactosa que está presente en la leche y los productos lácteos que han sido sometidos a un tratamiento térmico.⁹⁰ Durante su degradación, la lactulosa produce la acidificación del medio ambiente intestinal. Esta disminución en el pH desencadena mecanismos que explican su acción en la encefalopatía portosistémica y el estreñimiento.⁹¹ Más recientemente, la lactosa se ha

usado como un sustrato para la producción de factores bifidogénicos en forma de lactulosa, lactitol o lactosucrosa. En general, los derivados bifidogénicos son oligosacáridos de cadena corta (de 3 a 10 unidades de monosacárido) con las propiedades funcionales únicas de no ser digeridos en el estómago y el intestino delgado. Sirven como sustratos y estimulan el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en el intestino grueso e incrementan la cantidad de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} biodisponibles, además de retrasar o inhibir ciertas etapas de la carcinogénesis.^{92,93} La lactulosa se utiliza predominantemente como un producto farmacéutico para controlar el estreñimiento.⁹⁴

Se han realizado numerosos estudios que demuestran que la lactulosa contribuye al incremento de la población de bacterias beneficiosas en el intestino.⁹⁵ La incorporación de un 0,5% de lactulosa en formulaciones para lactantes promovió cambios en la microbiota, aumentando la población de las bifidobacterias, mientras que las fórmulas de control ocasionaron el crecimiento de las bacterias coliformes.⁹⁰ La administración, durante un tiempo prolongado, de leche fermentada con bifidobacterias y lactulosa a pacientes con cirrosis estabilizó la microbiota beneficiosa del intestino, y redujo el amoníaco y los fenoles libres en la sangre.⁹⁶ La lactulosa se ha utilizado ampliamente en el tratamiento de la encefalopatía hepática, la disminución de la concentración de amoníaco en la sangre y la prevención en el desarrollo de esta patología (Figura 1.8).^{97,98,38}

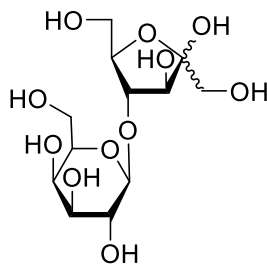


Figura 1.8. Estructura química de la lactulosa.

1.4.7. Polidextrosa (PDX)

La polidextrosa es un polisacárido sintetizado mediante la polimerización aleatoria de glucosa en presencia de pequeñas cantidades de sorbitol y un catalizador ácido.⁹⁹ La PDX no se digiere prácticamente en el intestino delgado. Aproximadamente el 60% se excreta en las heces y un 30% se fermenta en el intestino grueso por la microflora, donde se producen ácidos grasos volátiles y CO₂.¹⁰⁰ Según Hara y col. (2000),¹⁰¹ la polidextrosa es una fibra dietética que no es fácilmente fermentable, es muy estable y tiene una baja viscosidad. Su fermentación provoca el crecimiento de la microflora favorable, y la reducción de la de putrefacción, el aumento de la producción de SCFAs que reducen el PH intestinal y la eliminación de la producción de metabolitos cancerígenos. En un estudio en humanos, la polidextrosa mejoró la función intestinal y la facilidad de la defecación y además, inhibió la absorción excesiva de glucosa en el intestino delgado (Figura 1.9.).⁹⁹

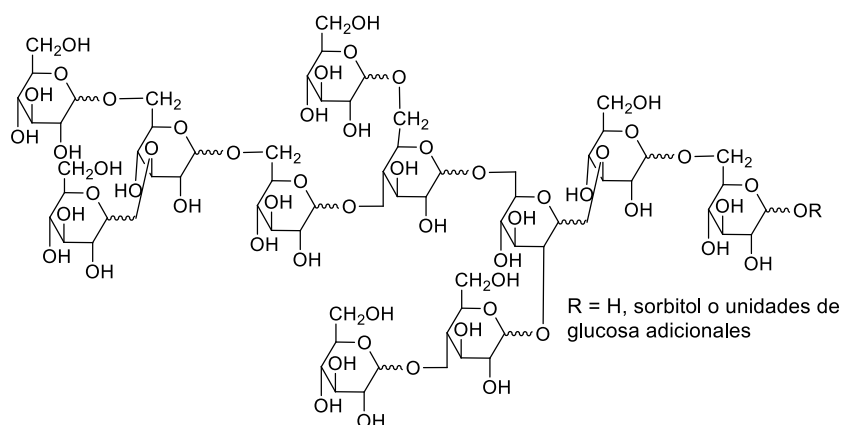


Figura 1.9. Estructura química de la polidextrosa.

1.5. Dianhidridos de fructosa (DAFs)

Dentro de los carbohidratos con propiedades prebióticas, se han estudiado también los dianhidridos de fructosa (abreviados como DAFs o DFAs – *difructose dianhydrides* – en varias publicaciones) y sus derivados glicosilados (glicosil-DAFs). Desde el punto de vista estructural son fructodisacáridos cíclicos, resultantes de la reacción de dimerización de la D-fructosa con la pérdida de dos moléculas de agua y la generación de dos enlaces glicosídicos.

Defaye y colaboradores¹⁰² estudiaron el comportamiento de la D-fructosa y de la inulina en presencia de fluoruro de hidrógeno (HF), observando la formación de una mezcla de DAFs en la que se identificaron seis isómeros. Los autores propusieron un mecanismo de formación de estos dianhidridos de fructosa según el cual se origina, en primer lugar, un catión fructosiloxocarbenio que reacciona con un grupo hidroxilo de otra molécula de D-fructosa del medio para dar un cetodisacárido intermedio (una fructobiosa), seguido de una reacción de espiroacetilación. Esta transformación es un proceso reversible que está gobernado por factores estereoelectrónicos, pudiendo dar lugar a cinco estructuras tricíclicas básicas: tres sistemas diespiroacetilicos y dos sistemas monoespiroacetilicos (Figura 10). Los DAFs pueden ser considerados los primeros miembros de la familia de los ciclofructanos

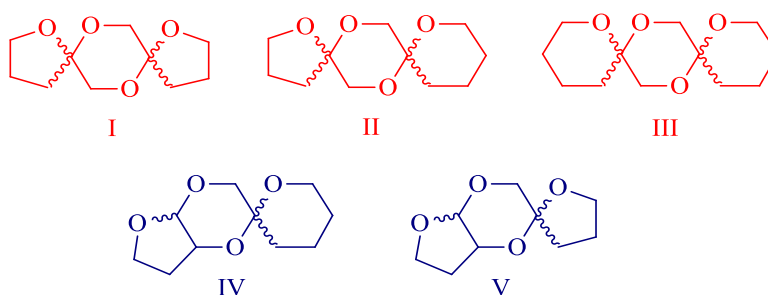


Figura 1.10. Estructuras tricíclicas generales de los dianhidridos de di-D-fructosa (DAFs). En rojo se representan los esqueletos de tipo diespiráricos y en azul los de tipo monoespiránico.

Los DAFs pueden originarse por activación térmica y por tratamiento con ácidos minerales de la D-fructosa o de la inulina, y se conocen desde el comienzo del siglo XX¹⁰³. Sin embargo, hasta no hace mucho permanecieron como curiosidades de laboratorio.^{104,105} Algunos DAFs se han aislado a partir de ciertos microorganismos y plantas superiores. La caracterización de algunos de ellos como edulcorantes no calóricos, acariogénicos y con potencial bifidogénico estimuló el estudio de los DAFs y despertó el interés tanto en su química como en el estudio de sus propiedades nutricionales.

La identificación de los DAFs en 1994 como los principales componentes no volátiles en el caramelo (hasta un 18% en un caramelo de sacarosa industrial) representó un punto de inflexión que proporcionó un importante y definitivo impulso para la realización de nuevos avances en este campo.¹⁰⁶ La transformación de la sacarosa en DAFs durante la caramelización implica que se trata de un proceso íntimamente ligado al arte culinario, lo que entronca con el concepto de gastronomía molecular.^{107,98} Las investigaciones recientes sobre los DAFs abarcan áreas diversas, incluyendo los productos naturales, la síntesis química, el análisis de alimentos, la nutrición y la salud. Ortiz Mellet y García Fernández (2010)¹⁰⁸ han llevado a cabo una revisión general de los avances en la química y la biología de los DAFs, y las perspectivas futuras como alimentos funcionales. Además de en el caramelo de sacarosa industrial,^{106,109} también se han encontrado DAFs en la achicoria tostada,¹¹⁰ en algunas frutas secadas,¹¹¹ en el café torrefacto tostado y natural^{112,113} y en el tequila tradicional.¹¹⁴

Los DAFs en las plantas superiores. La primera investigación sobre la formación de los DAFs en las plantas superiores se remonta a 1933, cuando Schlubach y Knoop¹¹⁵ aislaron, a partir de la alcachofa de Jerusalén, un compuesto identificado como 1,2':2,1'-dianhidrido de α -D-fructofuranosa β -D-fructofuranosa (DAF I, **10**; Figuras 1.11 y 1.12). La formación del 1,2':2,3'-dianhidrido de α -D-fructofuranosa β -

D-fructofuranosa (**DAF III, 1**; Figuras 1.11 y 1.12) en las raíces de *Lycoris radiata*, una planta usada en la medicina tradicional china, demostró inequívocamente la capacidad de la planta para producir este DAF particular.¹¹⁶

Los DAF producidos por microorganismos. La investigación de los DAFs como productos naturales se aceleró a mediados de la década de 1970 cuando Tanaka y Uchiyama publicaron el aislamiento de una inulinasa extracelular de una bacteria, *Arthrobacter ureafaciens*, capaz de producir 1,2':2,3'-dianhidrido de α -D-fructofuranosa β -D-fructofuranosa (**DAF III, 1**; Figuras 1.11 y 1.12) a partir de la inulina.^{117,118} A partir de este trabajo, se observó que varios microorganismos, la mayoría del género *Arthrobacter*, producían enzimas que promovían la transformación de fructanos (inulina o levano) en DAFs. Hasta ahora se han obtenido cuatro isómeros de DAFs por degradación enzimática de fructanos: **1 (DAF III)**, **10 (DAF I)**, 2,6':6,2'-dianhidrido de di- β -D-fructofuranosa (**DAF IV**), y 1,2':2,6'-dianhidrido de α -D-fructofuranosa β -D-fructofuranosa (**DAF V**).

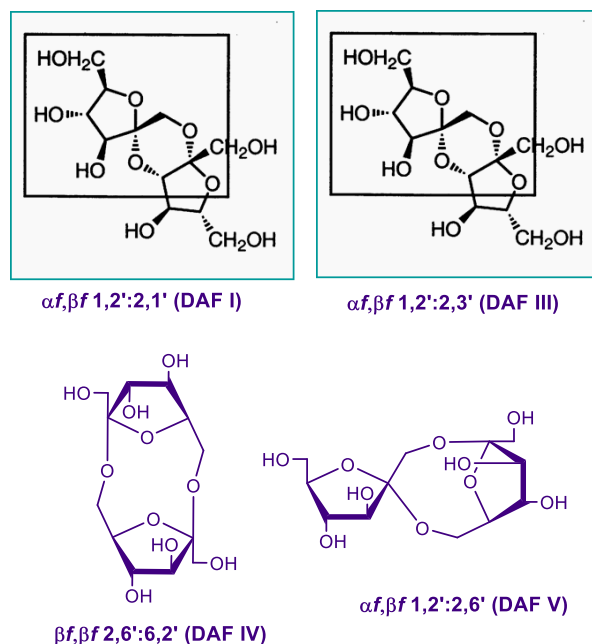


Figura 1.11. Estructuras de DAFs aislados de microorganismos y plantas superiores.

A escala preparativa, los DAFs se pueden obtener por métodos enzimáticos o químicos. En el primer caso se utilizan enzimas aisladas de microorganismos como *Arthrobacter*, *Pseudomonas* o *Aspergillus* para producir un isómero determinado, estando el número de DAFs accesible limitado a un restringido conjunto de estructuras. Los métodos químicos de preparación de DAFs consisten básicamente en la activación protónica de la D-fructosa o de otros azúcares que contengan este monosacárido, mediante el uso de ácidos minerales. En estos casos se obtienen mezclas complejas de varios isómeros (hasta trece diastereómeros), cuya composición dependen de las condiciones de reacción (Figura 1.12). La falta de procedimientos eficientes de producción, purificación y análisis de DAFs ha supuesto un impedimento importante en el desarrollo de aplicaciones.

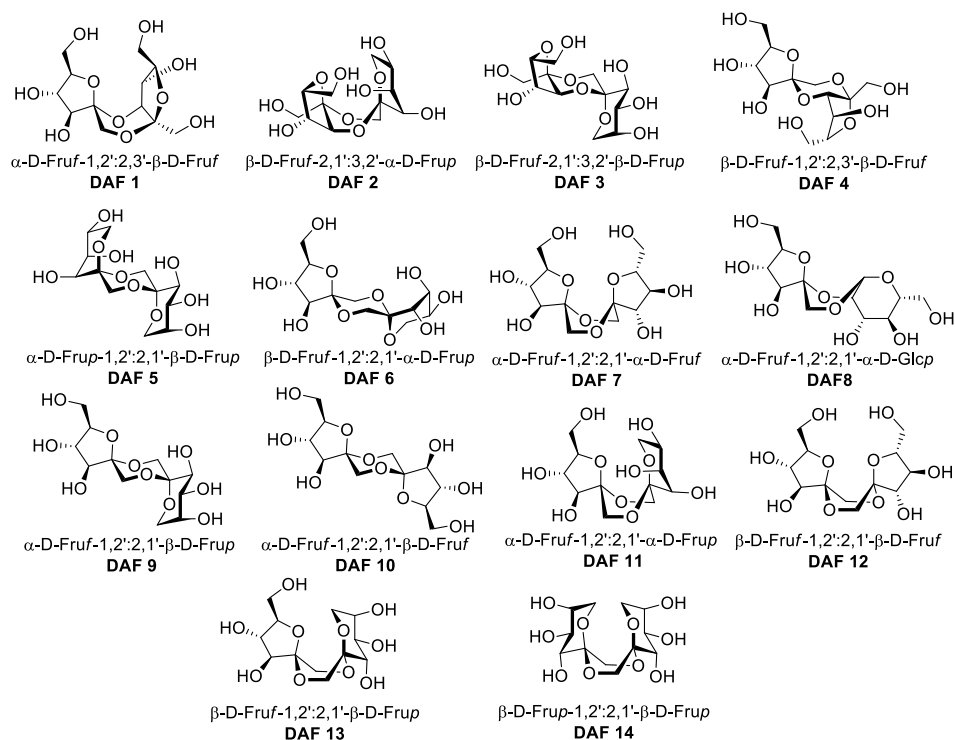


Figura 1.12. Estructura química de los 13 dianhidridos de di-D-fructosa (DAFs; **1-7** y **9-14**) y del dianhidrido mixto de fructosa y glucosa (**8**) identificados en el caramelo de sacarosa.

1.5.1. Importancia de los DAFs como alimentos funcionales en la nutrición

La información existente sobre las propiedades nutricionales de los DAFs como alimentos funcionales se limita a los isómeros individuales que se pueden producir mediante procesos biotecnológicos, fundamentalmente los compuestos **1** (**DAF III**), **10** (**DAF I**), y el (**DAF IV**, Figura 1.11).

La mayoría de los trabajos se centraron inicialmente en el DAF III por su posible aplicación como edulcorante bajo en calorías. El DAF III presenta un poder

edulcorante que es la mitad que el de la sacarosa. Se trata de un compuesto químicamente muy estable, más resistente a la descomposición que la sacarosa y con menor reactividad tipo Maillard en condiciones de reacción ácidas.¹¹⁹ La ingestión de DAF III previene el cáncer colorrectal y constituye un nuevo candidato como prebiótico. Promueve el crecimiento in vitro de las bifidobacterias, es anticariogénico y previene la caída y descomposición dental

Los DAF III y DAF IV son producidos en gran escala mediante procesos biotecnológicos y se ha demostrado que son oligosacáridos no digeribles. Los microorganismos intestinales los utilizan y los transforman en ácidos orgánicos tales como acetato, butirato y lactato. Estos ácidos orgánicos reducen el pH del contenido cecal y aumentan la solubilidad del calcio, lo que conduce a la mejor absorción de este mineral.¹²⁰

Numerosos estudios acerca de los efectos de la administración del DFA III, indican que afecta de manera beneficiosa la microbiota intestinal en los seres humanos y en las ratas.^{121,122,123,124} En sujetos que ingirieron DAF III durante 12 meses se identificó que la bacteria *Riminococcus productus* AHU1760 era capaz de utilizar este DAF. Los resultados indicaron que la ingestión del DFA III incrementa los ácidos orgánicos totales en las heces y disminuye el pH fecal y la proporción de ácidos biliares secundarios (ABS) con respecto a los ácidos biliares totales. Los ABS promueven la carcinogénesis de colon y la formación de cálculos biliares.¹²³

Tanto el DAF III como el DAF IV afectan las uniones entre células de los tejidos epiteliales, promoviendo así la asimilación de calcio y magnesio y la absorción de zinc en el intestino delgado y grueso de las ratas.^{125,126} El DAF III también previene la supresión de la absorción del hierro inducida por el ácido tánico y contribuye a la resistencia ósea, protegiendo de la anemia¹²⁷ y previniendo la osteoporosis.¹²⁸ El DAF III promueve el transporte en el intestino delgado¹²⁹ y la disponibilidad de los glucósidos de quercetina como la α G-rutina. Este es un glucósido flavonoide soluble

en agua, con actividad antioxidante y con efectos beneficiosos para la salud, que es producido a escala industrial y está disponible comercialmente.^{130,131}

Los trabajos sobre las propiedades nutricionales de los productos heterogéneos con un alto contenido en DAF son todavía bastante escasos. En uno de ellos se ha observado que los condensados ácidos de palatinosa, un disacárido constituido por glucosa y fructosa con unión α -(1→6), contienen proporciones significativas de glucosil-DFA y pueden inducir el aumento de las bifidobacterias en el intestino humano.¹³²

Algunos estudios han revelado, que la incorporación de la mezcla de oligosacáridos obtenidos a partir de sacarosa por pirolisis con ácido cítrico (*sucrose thermal oligosaccharides*, STOC), en cantidades relativamente bajas, en la dieta de pollos, aumentó el crecimiento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* en el cecum. Además, causó un aumento considerable en la tasa de crecimiento de los pollos y una mejora significativa en la conversión en alimento.¹³³

Recientemente, se ha encontrado que los productos enriquecidos en DAFs obtenidos por la caramelización de la fructosa utilizando resinas ácidas de intercambio iónico, conteniendo aproximadamente un 70% de DAF y glicosil-DAFs, promueven el desarrollo de bacterias beneficiosas en ratas, confirmado su comportamiento como prebiótico.¹³⁴

Los caramelos enriquecidos en DAFs también ejercieron un evidente efecto beneficioso y protector en un modelo de rata para la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn) en humanos. El efecto del caramelo enriquecido en DAFs fue significativamente más alto que el obtenido usando DAF III puro. En conclusión, los caramelos enriquecidos en DAF actúan previniendo el daño del colon y pueden tener un efecto de recuperación del colon afectado. De esta manera, pueden comportarse como un alimento con propiedades similares a un fármaco, que es la definición de un nutraceutico.^{108,135}

1.6. Caramelos: de la química de carbohidratos a la gastronomía molecular y los alimentos funcionales

El caramelo forma parte de la dieta de la humanidad desde muy antiguo. Hoy en día, su producción y consumo supera un nivel estimado de 50 millones de toneladas anuales.¹³⁶ Además de una receta básica de la gastronomía popular, es un ingrediente o aditivo alimentario ampliamente utilizado en multitud de productos industriales destinados tanto a la alimentación humana como animal por sus propiedades aromatizantes o colorantes. Sin embargo, aunque el avance en las técnicas de análisis ha sido espectacular a lo largo del siglo 20, los constituyentes mayoritarios del caramelo no se han identificado hasta hace relativamente poco tiempo. Desde el punto de vista químico, lo único bien establecido era que la caramelización de un azúcar conlleva la acidificación del producto y que el medio ácido cataliza la caramelización. El estudio de la reactividad de los azúcares en medio ácido aportó, de hecho, las claves para descifrar este enigma.

Químicamente el caramelo es una mezcla compleja, obtenida por calentamiento de un azúcar o mezcla de azúcares, en estado sólido o en disolución concentrada, en presencia o no de aditivos durante el calentamiento. La humedad es un factor importante que afecta a la textura y el gusto. La estabilidad del color y el sabor también se consideran características importantes para su aplicabilidad. Un tipo de caramelización que produce un sabor particular se obtiene por tratamiento alcalino; por ejemplo, en presencia de bicarbonato de sodio. La acción del amoníaco sobre determinados azúcares reductores produce un caramelo con un color más intenso. El material polimérico presente en el caramelo natural se genera a partir de las reacciones de condensación de los aldehídos y cetonas formados por calentamiento de azúcares con bases o ácidos.¹³⁷⁻¹³⁸

El caramelo colorante utiliza desde hace tiempo en una amplia variedad de productos. Aunque los consumidores consideran el caramelo como una sola sustancia, en realidad se

trata de una familia de materiales similares con propiedades ligeramente diferentes. Cada tipo de caramelo tiene propiedades (color, estabilidad, etc.) específicas que garantizan la compatibilidad con el producto al que se va a incorporar y evitan efectos indeseables, tales como turbidez, floculación y separación. Los colores del caramelo varían de marrón oscuro a negro, y dependiendo de su consistencia pueden ser líquidos o sólidos que tienen un olor a azúcar quemado y, en muchos casos, un agradable sabor algo amargo. Son totalmente miscibles con el agua y contienen agregados coloidales que dan cuenta de la mayor parte de sus propiedades colorantes y determinan su comportamiento característico hacia los ácidos, electrolitos y taninos.

Los caramelos industriales se clasifican en dos grandes grupos:

Caramelo aromático. Jarabe o sólido marrón pálido a oscuro, obtenido por calentamiento controlado de azúcar de grado alimentario. Pueden añadirse pequeñas cantidades de ácido carboxílico para promover la hidrólisis del material oligo- y polisacárido. La acidez inherente del caramelo puede neutralizarse tras el proceso de caramelización.

Caramelo colorante. Líquido o sólido marrón oscuro, obtenido por calentamiento controlado de azúcar de grado alimentario. Pueden añadirse varios promotores de caramelización. Se emplea como colorante en productos de alimentación, cervezas, bebidas alcohólicas, etc.

La aplicación más extendida del caramelo es como colorante. Se entiende por colorantes aquellas sustancias que añaden o devuelven color a un alimento, e incluyen componentes naturales de sustancias alimentarias y otras fuentes naturales que no son normalmente consumidos como alimentos por sí mismos y no son habitualmente utilizados como ingredientes característicos en alimentación.¹³⁹ Son preparados obtenidos a partir de los alimentos y otras materias naturales mediante extracción física o química que en ocasiones pueden ser pigmentos que se usan como componentes nutritivos o aromáticos.

Dentro de la lista de colorantes alimentarios permitidos se recogen diferentes tipos de caramelos, que tienen la consideración de aditivo alimentario y se identifican por el código E-150 (a, b, c y d):

- Caramelo natural (E150a). Para activar la caramelización, pueden emplearse ácidos, álcalis y sales salvo compuestos amónicos y sulfitos
- Caramelo de sulfito cáustico (E150b). Se obtiene en presencia de compuestos sulfíticos (ácido sulfuroso, sulfito potásico o sódico, bisulfito potásico o sódico) sin que se utilicen compuestos amónicos.
- Caramelo amónico (E150c). Se emplean compuestos amónicos (hidróxido, carbonato, bicarbonato y fosfato amónico).
- Caramelo de sulfito amónico (E150d). Se prepara en presencia de compuestos sulfíticos y amónicos.

1.6.1. Reacciones de caramelización

En la industria alimentaria el procesamiento térmico de los alimentos es de particular interés. Durante la cocción de los alimentos ricos en azúcar se producen reacciones de pardeamiento no enzimático, que incluyen la reacción de Maillard y las reacciones de caramelización, dependiendo de que junto con los azúcares estén presentes derivados aminados. El producto complejo obtenido de tipo caramelo juega un papel importante para la industria debido al aporte de sabor, aroma, color y dulzura. Durante miles de años el caramelo se ha utilizado con este objetivo de dar color y sabor tanto a los alimentos como las bebidas (por ejemplo, la cerveza, sopas y dulces).^{140,141}

Como se ha comentado, el proceso de caramelización normalmente ocurre cuando los azúcares, o los productos que contienen alta proporción de azúcares, se calientan en seco o en soluciones acuosas concentradas, en presencia o no de ciertos aditivos. Durante esta activación térmica, los azúcares sufren diferentes reacciones de degradación,

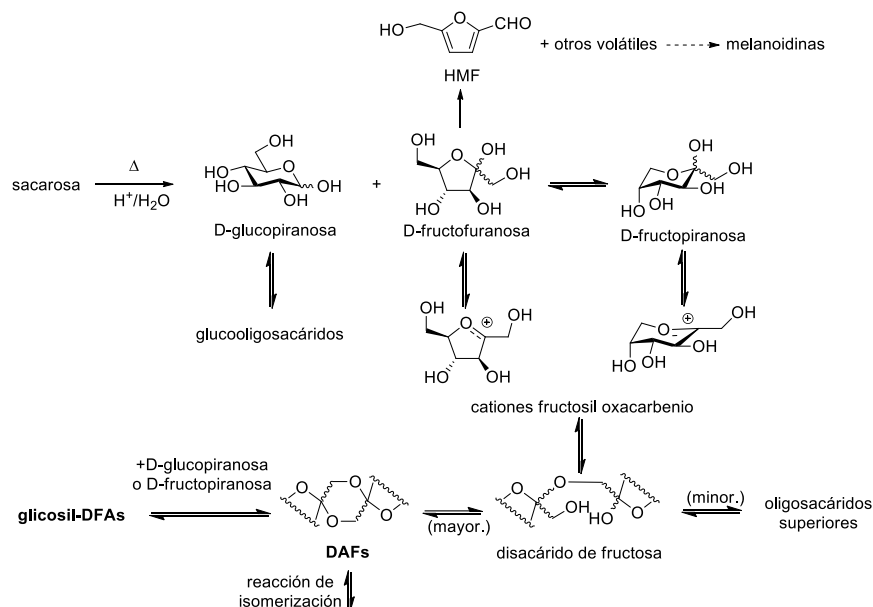
polimerización y condensación. El resultado es una mezcla compleja de fracciones volátiles y fracciones no volátiles de compuestos de bajo y alto peso molecular.¹⁴²

Como consecuencia del tratamiento térmico de los azúcares, se producen reacciones de deshidratación y de auto-condensación. La fracción de compuestos volátiles que resulta corresponde al 5% del caramelo (fundamentalmente 5-hidroximetilfurfural, HMF). El 95% del caramelo corresponde a la fracción no volátil, que incluye los pigmentos (melanoidinas) que aportan color al caramelo. Pero la mayor parte de esta fracción no volátil está constituida por azúcar residual y material oligosacárido. Entre los componentes presentes en esta fracción se encuentran los dianhidridos de fructosa (DAF) y sus derivados glicosilados (glicosil-DAFs) de diferente DP, algunos de los cuales han sido identificados.

La formación de los DAFs en el caramelo es un proceso promovido por el medio ácido. De hecho, la comparación de la reactividad de azúcares como la fructosa o la sacarosa inducida por fluoruro de hidrógeno (HF), que puede considerarse como un promotor que favorece la formación de DAFs, y la inducida por calor (caramelización clásica) permitió proponer el Esquema 1.1 para las transformaciones que tienen lugar durante la caramelización en el caso de la sacarosa como azúcar de partida.

Lo primero que tiene lugar tanto en la activación de sacarosa con HF como durante su caramelización, es la hidrólisis del disacárido en sus constituyentes monosacáridos D-glucosa y D-fructosa. La primera puede sufrir reacciones de auto-glicosidación (reversión) para originar glucooligosacáridos. Simultáneamente tiene lugar la dimerización de la D-fructosa para dar DAFs, así como interconversiones entre los diferentes isómeros de DAFs a través de un fructodisacárido intermedio. Los DAFs pueden también actuar como aceptores en reacciones de reversión para dar glicosil-DAFs. Todos estos procesos de formación de oligosacáridos son reversibles y compiten con las reacciones de deshidratación intramoleculares irreversibles que conducen a compuestos volátiles, especialmente a 5-hidroximetilfurfural (HMF).^{143,144} Los procesos de

condensación y deshidratación no específicos que implican compuestos volátiles y no volátiles están en el origen de las melanoidinas de alto peso molecular responsables del desarrollo del color. Aunque los DAFs difructofuranosídicos (**7** ó **10**) están cinéticamente favorecidos, isomerizan para dar los derivados fructopiranosídicos, más estables termodinámicamente (por ejemplo, **5**, **9** ó **13**).



Esquema 1.1. Mecanismo general de caramelización de la sacarosa por tratamiento térmico y ácido.

1.6.2. Preparación de caramelos enriquecidos en DAFs.

En este apartado se describirán los resultados relacionados con nuevas tecnologías de caramelización que favorecen la formación de DAFs y glicosil-DAFs. Los primeros trabajos consistieron en la pirólisis de la sacarosa,¹⁴⁵ la inulina^{146,147} o la isomaltulosa (6-*O*- β -D-glucopiranosil-D-fructofuranosa, palatinosa)¹⁴⁸ en presencia de ácido cítrico. Este procedimiento permitió obtener productos con proporciones de

DAFs y glicosil-DAFs de hasta un 40%, con propiedades nutricionales beneficiosas en animales.¹³³

Estudios de fermentación *in vitro* con bacterias fecales humanas llevados a cabo con el producto resultante del calentamiento de la inulina seca a 195 °C, conteniendo una proporción significativa de DAFs,¹⁴⁹ indicaron una estimulación del crecimiento de las bifidobacterias y otras bacterias beneficiosas acompañado de una disminución significativa de bacterias patógenas. Este efecto fue más acusado que el obtenido con muestras de inulina que no se habían sometido a calentamiento.¹⁵⁰ Sin embargo, las altas temperaturas usadas en la metodología de pirólisis requieren un estricto control del procedimiento para garantizar su reproducibilidad. Esta limitación ha estimulado la investigación en nuevos métodos de caramelización que permitan obtener altas conversiones en DAFs con un control total de la composición del producto final y técnicamente apropiado para estudios nutricionales y aplicaciones.

En trabajos anteriores a esta Tesis se exploró la posibilidad de utilizar resinas ácidas de intercambio iónico para promover la caramelización de disoluciones concentradas de fructosa y se observó un aumento significativo en la proporción de DAFs^{134, 151} Suárez y col., (2010)¹⁵² encontraron que mediante esta tecnología pueden obtenerse productos con un 70-80% de DAFs y glicosil-DAFs a partir de fructosa o mezclas de fructosa con otros carbohidratos de calidad alimentaria.¹⁵³ Las resinas de intercambio iónico son ampliamente utilizadas como catalizadores en procesos industriales, incluyendo la industria alimentaria. La resina se puede separar del producto final mediante filtración, es reutilizable, se puede adaptar a procesos continuos y permite un control preciso de los parámetros de reacción.¹⁵⁴ En esta Tesis hemos profundizado en estos estudios centrándonos en la utilización de diferentes azúcares en combinación con el uso de catalizadores ácidos heterogéneos como promotores de la caramelización.

1.6.3. Caramelos enriquecidos en DAFs y sus propiedades prebióticas

La enfermedad inflamatoria intestinal, EII (en inglés, *Inflammatory bowel diseases*; IBD) es una enfermedad de estado inflamatorio del tracto gastrointestinal que se manifiesta como colitis ulcerosa (*ulcerative colitis*, UC) o enfermedad de Crohn (*Crohn's disease*, CD). Se cree que es el resultado de una combinación de factores genéticos, inmunológicos y ambientales, que pueden canalizarse a través de una anomalía en la función de la barrera intestinal. En las últimas dos décadas se ha producido un aumento importante de su incidencia, afectando a millones de personas en los países occidentales. Existen además evidencias de que un desequilibrio de la flora colónica puede ser también responsable de la patogénesis de la IBD¹⁵⁵⁻¹⁵⁶

Algunas de las bacterias intestinales comensales inducen y perpetúan la inflamación intestinal crónica, mientras que otras son protectoras. La mayoría de los medicamentos actuales están dirigidos contra la respuesta inmunitaria proinflamatoria exagerada del huésped y se trata de medicamentos tóxicos y/o costosos. La incorporación de prebióticos en la alimentación cambia la composición de la microflora intestinal, favoreciendo la proliferación de bacterias intestinales protectoras, y modifica así la respuesta inmunológica y la composición de la mucosa del huésped, pudiendo ser una alternativa atractiva al tratamiento con fármacos para las IBD.^{32, 157}

Los productos enriquecidos en DAFs obtenidos mediante la metodología basada en la catálisis con resina ácida han mostrado efectos beneficiosos en un modelo animal para la EII (enfermedad de Crohn).¹³⁴ Los estudios se realizaron sobre ratas Wistar¹⁵⁸ a las que se indujo una lesión en el colon por tratamiento con ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS). Se genera así un modelo equivalente a la enfermedad de Crohn en humanos. La administración en la dieta de caramelos enriquecidos en DAFs, preparados a partir de D-fructosa usando resina ácida Lewatit® S2328 como catalizador, produjo un efecto reparador importante, favoreciendo además el desarrollo de una flora intestinal beneficiosa, de tipo *Bifidus* y *Lactobacillus*. El análisis histológico mostró que la

regeneración de los colonocitos en las ratas que habían incorporado el caramelo enriquecido en DAFs en la dieta era mucho más rápida que en aquellos animales que había recibido el pienso normal. Los resultados fueron comparables a los obtenidos con el FOS (Figura 1.13).¹³⁵

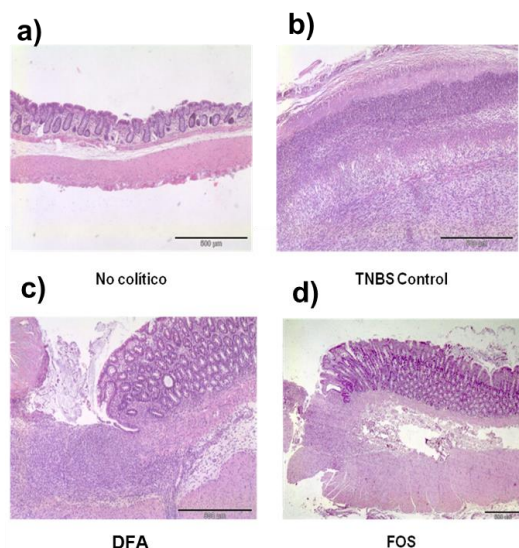


Figura 1.13. Secciones histológicas de mucosa del colon en ratas. No colítico (a).

Control TNBS (b). Colon de ratas tratadas con caramelo enriquecido con DAFs (c) o FOS (d), mostrando la mejora en el proceso inflamatorio y la “restauración” del tejido de la mucosa, con la presencia de colonocitos.

Los mismos autores han puesto de manifiesto que la administración de caramelos enriquecidos en DAFs mezclados con el pienso a pollos¹³⁵ y cerdos¹⁵⁹ también ejerce un efecto prebiótico,¹⁵⁹ favoreciendo el desarrollo de una flora intestinal beneficiosa, con una mayor población de *Bifidobacteria* y *Lactobacillus* y concentraciones más altas de SCFAs en el colon.. En las fermentaciones in vitro se empleó contenido cecal de pollos y como sustrato el caramelo de fructosa enriquecido en DAFs (CF) al 0.5, 1 y 2% y caramelo de sacarosa (CS) comercial Nigay al 1%. Tras los experimentos de fermentación, se observó una disminución del pH dependiente de la dosis de caramelo y la formación de lactato,

que aumentó significativamente de manera dependiente de la dosis de caramelo suministrada. Por otro lado, respecto a los ácidos grasos volátiles se observó un efecto de su producción. El recuento bacteriano determinando los contenidos totales de bacterias por qPCR, permitió observar un aumento de *Lactobacillus*, indicativo del efecto prebiótico del caramelo. Un estudio similar se llevó a cabo con cerdos y mostró resultados análogos. En este caso, las muestras fecales se trataron por diafiltración se obteniendo un extracto que fue analizado por CG-FID observando una proporción DAF **9**: DAF **10**, prácticamente idéntica a la encontrada tras los ensayos de fermentación in vitro. La determinación cuantitativa indicó que la digestibilidad del caramelo enriquecido en DAFs es mayor del 95%. El conjunto de resultados obtenidos en modelos animales indican que los caramelos enriquecidos en DAFs en animales sanos solo afectan levemente a las bacterias intestinales mientras que en ratas donde el equilibrio bacteriano se encuentra alterado se observa una recuperación importante del mismo.¹⁵⁹

Bibliografía

1. Menrad, K., *Res. Policy*, **2004**, 33, 845-878.
2. Roberfroid, M. B., *Nutr.*, **2000b**, 16, 689-691.
3. Kotilainen, L.; Rajalahti, R.; Ragasa, C.; Pehu, E., *Discussion Paper 30. Washington, DC: World Bank.*, **2006**.
4. Roberfroid, M. B., *Am. J. Clin. Nutr.*, **2000a**, 71, 1660s-1664s.
5. Betoret, E.; Betoret, N.; Vidal, D.; Fito, P., *Trends Food Sci. Tech.*, **2011**, 22, 498-508.
6. Arai, S., *BioFactors (Oxford, England)*, **2000**, 12, 13-6.
7. Milner, J. A., *Am. J. Clin. Nutr.*, **2000**, 71, 1654s-1659s.
8. Vicentini, A.; Liberatore, L.; Mastrocola, D., *J. Food Sci.*, **2016**, 28, 338-351.
9. Bigliardi, B.; Galati, F., *Trends Food Sci. Technol.*, **2013**, 31, 118-129.
10. Hasler, C. M., *Food Technol.*, **1998**, 52, 57-62.
11. Hardy, G., *Nutr.*, **2000**, 16, 688-689.
12. Kwak, N. S.; Jukes, D. J., *Food Control*, **2001**, 12, 99-107.
13. Silveira Rodríguez, M. B.; Monereo Megías, S.; Molina Baena, B., *Rev. Esp. Salud Pública*, **2003**, 77, 317-331.
14. St-Onge, M.-P., *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, 81, 7-15.
15. Milner, J. A., *J. Nutr.*, **1999**, 129, 1395S-1397s.
16. Diplock AT, A. P., Ashwell M, Bornet F, Fern EB, Robertfroid, *Br. J. Nutr*, **1999**, 81, S1-S27.
17. Sloan, A. E., *Food Technol.*, **2000**, 54, 33-62.
18. Spence, J. T., **2006**, 19, S4-S6.
19. Sloan, E., *Food Technol.*, **2002**, 56, 32-57.
20. Makinen-Aakula, M., **2006**.
21. Al-Sheraji, S. H.; Ismail, A.; Manap, M. Y.; Mustafa, S.; Yusof, R. M.; Hassan, F. A., *J. Funct. Foods*, **2013**, 5, 1542-1553.
22. Playne, M. J.; G.C., R., **2004**.
23. Sloan, A. E., *Food Technol.*, **2004**, 58, 28-51.
24. Menrad, K., *J. Food Eng.*, **2003**, 56, 181-188.
25. Ouwehand, A. C., *FFNet meeting on functional foods.*, **2007**.
26. Cantor, C. R., *Tibtech.*, **2000**, 18, 6-7.
27. Kozonova J., P. N., *Холодильна техніка та технологія (Odessa National Academy of Food Technologies)*, **2014**, 51.

28. M. Saarela, L. L., R. Crittenden, S. Salminen, T. Mattila-Sandholm Int. , *J. Food Microbiol.* , **2002**, 78, 99-117.
29. Siró, I.; Kápolna, E.; Kápolna, B.; Lugasi, A., *Appetite*, **2008**, 51, 456-467.
30. Gibson, G. R.; Roberfroid, M. B., *J. Nutr.*, **1995a**, 125, 1401-1412.
31. McFarlane, S.; Macfarlane, G. T., *Ed. Fuller, R. and Perdigon, G. Oxford: Blackwell Publishing*, **2003**, 24-51.
32. Roberfroid M. B., *J. Nutr.*, **2007**, 137, S830-S837.
33. S. I. Cook, J. H. S., *Aliment. Pharmacol Ther.*, **1998**, 12, 499-507.
34. Macfarlane, G. T.; Steed, H.; Macfarlane, S., *J. Appl. Microbiol.*, **2008**, 104, 305-344.
35. Kaur, N.; Gupta, A. K., *J. Biosci.*, **2002**, 27, 703-714.
36. Saier Jr, M. H.; Mansour, N. M., *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **2005**, 10, 22-25.
37. Bosscher, D.; Loo-Van, J.; Franck, A., *Nutr. Res. Rev.* , **2006**, 19, 216-226.
38. Caselato de sousa, V. M., *Food Nutr. Sci.*, **2011**, 02, 133-144.
39. Lomax, A.; Calder, P., *Br. J. Nutr.*, **2009**, 101, 633-658.
40. Hugenholtz, J.; Smid, E. J., *Curr. Opin. Biotech.*, **2002**, 13, 497-507.
41. Fooks, L. J.; Fuller, R.; Gibson, G. R., *Int. Dairy J.*, **1999**, 9, 53-61.
42. Delzenne, N. M., *Proc. Nutr. Soc.*, **2003**, 62, 177-182.
43. Bounik, Y.; Raskine, L.; Simoneau, G.; Vicaut, E.; Neut, C.; Flourie, B.; Brouns, F.; Bornet, F., *J. Nutr.*, **2004**, 80, 1658-1664.
44. Ouwehand, A. C.; Derrien, M.; de Vos, W.; Tiihonen, K.; Rautonen, N., *Curr. Opin. Biotech.*, **2005**, 16, 212-217.
45. Topping, D. L.; Clifton, P. M., *Physiol. Rev.*, **2001**, 81, 1031-1064.
46. Manning, T. S.; Gibson, G. R., *Best Prac. Res. Cl. Ga.* , **2004**, 18, 287-298.
47. Zentec, J.; Marquart, B.; Pietrzak, T., *J. Nutr.*, **2002**, 132, S1682-S1684.
48. Olano-Martín, E.; Williams, M. R.; Gibson, G. R.; Rastall R. A., *FEMS Microbiol. Lett.* , **2003**, 218, 101-105.
49. Morgan, A. J.; Mul, A. J.; Beldman, G.; Voragen, A. G. J., *AGRO Fd Indust. High. Technol.* , 3, 35-38.
50. Campbell, J. M.; Fahey Jr, G. C.; Lichtensteiger, C. A.; Demichele, S. J.; Garleb, K. A., *J. Nutr.*, **1997b**, 127 (1), 137-145.
51. Gibson, G. R.; Fuller, R., *J. Nutr.*, **2000**, 130, 391.
52. Playne, M. J.; Bennett, L. E.; Smithers, W., *Aust. J. Dairy Technol.* , **2003**, 58, 242-264.
53. Gibson, G. R.; Berry Ottaway, P.; Rastall, R. A., *Chandos Publishing Limited, Oxford*, **2000**.

54. Gibson G. R., M. G. T., *J. Nutr.*, **1995b** (eds).
55. Napolitano, A.; Costabile, A.; Martin-Pelaez, S.; Vitaglione, P.; Klinder, A.; Gibson, G. R.; Fogliano, V., *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **2009**, *19*, 283-290.
56. Roberfroid, M. B., *Br. J. Nutr.*, **2005**, *93*, S13-25.
57. Tamime, A. Y.; Marshall, V. M. E.; Robinson, R. K., *J. Dairy Res.*, **1995**, *62*, 151-187.
58. Pereira, D. I. A.; Gibson, G. R., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **2002**, *37*, 259-281.
59. Coudray, C.; Demigne, C.; Rayssiguier, Y., *J. Nutr.*, **2003**, *133*, 1-4.
60. Wang, X.; Gibson, G. R., *J. Appl. Bacteriol.*, **1993**, *75*, 373-380.
61. Roberfroid, M. B., *CRC Crit. Rev. Food Sci.*, **1993**, *33*, 103-148.
62. Cummings, J. H.; MacFarlane, G. R.; Englys, H. N., *Am. J. Clin. Nutr.*, **2001**, *73*, 415S-450S.
63. Carpita, N. C.; J. Kamabus, J.; Housley, T. L., *J. Plant Physiol.*, **1989**, *134*, 162-168.
64. Pool-Zobel, B.; van Loo, J.; Rowland, I.; Roberfroid, M. B., *Br. J. Nutr.*, **2007**, *87*, S273-S281.
65. Femia, A. P.; Luceri, C.; Dolaro, P.; Giannini, A.; Biggeri, A.; Salvadori, M.; Clune, Y.; Collins, K. J.; Paglierani, M.; Caderni, G., *Carcinogenesis*, **2002**, *23*, 1953-1960.
66. de Luis, D. A.; de la Fuente, B.; Izaola, O.; Conde, R.; Gutierrez, S.; Morillo, M.; Teba Torres, C., *Nutricion Hospitalaria*, **2010**, *25*, 53-59.
67. Sako, T.; Matsumoto, K.; Tanaka, R., *Int. Dairy J.*, **1999**, *9*, 69-80.
68. Brouns, F.; Vermeer, C., *Trends Food Sci. Tech.*, **2000**, *11*, 22-33.
69. Moro, G.; Minoli, I.; Mosca, M.; Fanaro, S.; Jelinek, J.; Stahl, B.; Boehm, G., *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, **2002**, *34*, 291-295.
70. Scholtens, P. A.; Alles, M. S.; Bindels, J. G.; van der Linde, E. G.; Tolboom, J. J.; Knol, J., *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, **2006**, *42*, 553-559.
71. Bruzzese, E.; Volpicelli, M., ;; Salvini, F.; Bisceglia, M.; Lionetti, P.; Cinquetti, M.; Iacono, G.; Guarino, A., *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, **2006**, *42*, 2-18.
72. Bakker-Zierikzee, A. M.; van Tol, E. A. F.; Kroes, H.; Alles, M. S.; Kok, F. J.; Bindels, J. G., *Pediatr. Allergy Immu.*, **2006**, *17*, 134-140.
73. Evtuguin, D. V.; Tomás, J. L.; Silva, A. M.; Neto, C. P., *Carbohydr. Res.*, **2003**, *338*, 597-604.
74. Moura, P.; Barata, R.; Carvalheiro, F.; Girio, F.; Loureiro-Dias, M. C.; Esteves, M. P., *Food Sci. Technol.*, **2007**, *40*, 963-972.

75. Nabarlantz, D.; Ebringerova, A.; Montane, D., *Carbohydr. Polym.*, **2007**, 69, 20-28.
76. Parajo, J. C.; Garrote, G.; M., C. J.; Dominguez, H., *Trends Food Sci. Technol.*, **2004**, 15, 115-120.
77. Hsu, C.; Liao, J. W.; Chung, Y. C.; C. P. Hsieh, C. P.; Chan, Y. C., *J. Nutr.*, **2004**, 134, 1523-1528.
78. Modler, H. W., *Int. Dairy J.*, **1994**, 4, 383-407.
79. Tateyama, I.; Hashii, K.; Johno, I.; Iino, T.; Hirai, K.; Suwa, Y.; Kiso, Y., *J. Nutri. Sci. Vitaminol.*, **2005**, 51, 445-448.
80. Bhat, M. K., *Recent Res. Dev. Agr. Food Chem.*, **1998**, 2, 787-802.
81. Jeong, J. K.; Park, Y. I.; Kim, S. M.; Kim, C. S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1998**, 50, 113-118.
82. Suwa, Y.; Koga, K.; Fujikawa, S.; Okazaki, M.; Irie, T.; Nakada, T., *USA Patent US 5939309*, **1999**.
83. Campbell, J. M.; C., F. J. G.; Wolf, B. W., *J. Nutr.*, **1997a**, 127, 130-136.
84. Okazaki, M.; Koda, H.; Izumi, R.; Fujikawa, S.; Matsumoto, N., *J. Nutr. Japanese Soc. Nutr. Food Sci.*, **1991**, 44, 41-44.
85. Joo, G. J.; Rhee, I. K.; Kim, S. O.; Rhee, S. J., *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **1998**, 27, 705-711.
86. Jaskari, J.; Kontula, P.; Siitonen, A.; Jousimies-Somer, H.; Mattilasandholm, T.; Poutanen, K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1998**, 49, 175-181.
87. Rycroft, C. E.; Jones, M. R.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A., *J. App. Microbiol.*, **2001**, 91, 878-887.
88. Makelainen, H.; Forssten, S.; Saarinen, M.; Stowell, J.; Rautonen, N.; Ouwehand, A. C., *Benef. Microbes*, **2010**, 1, 81-91.
89. Panesar, P. S.; Bali, V., *Encyclopedia of Food and Health*, **2016**, 464-471.
90. Nagendra, R.; Viswanatha, S.; Arun Kumar, S.; Krishna Murthy, B.; Venkat Rao, S., *Nutr. Res.*, **1995**, 15, 15-24.
91. Schumann, C., *Eur. J. Nutr.*, **2002**, 41, 17-25.
92. Oku, T., I. Goldberg, Ed., *Functional Foods*, Chapman and Hall, New York,, **1994**, 202-218.
93. Young, J. N., *IFT Annual Meeting, Orlando*, **1997**, 93-97.
94. Mussatto S.I., O. I. M., Ismael M., *Carbohydr. Polym.*, **2007**, 68, 587-597.
95. Bouhnik, Y., *Nutr. Cancer.*, **1996**, 26, 21-29.
96. Arunachalam, K. D., *Nutr. Res.*, **1999**, 19, 1559-1597.
97. Bezkorovainy, A., *Am. J. Clin. Nutr.*, **2001**, 73, 399S-405S.

98. This, H.; Rutledge, D., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009a**, 394, 659-661.
99. Jie, Z.; Bang-yao, L.; Ming-jie, X.; Hai-wei, L.; Zu-kang, Z.; Ting-song, W.; Craig, S. A., *Am. J. Clin. Nutr.*, **2000**, 72, 1503-1509.
100. Yoshioka, M.; Shimomura, Y.; Suzuki, M., *J. Nutr.*, **1994**, 124, 539-547.
101. Hara, H.; Suzuki, T.; Aoyama, Y., *Br. J. Nutr.*, **2000**, 84, 665-661.
102. Defaye, J.; Gadelle, A.; Pedersen, C., *Carbohydr. Res.*, **1985**, 136, 53-65.
103. McDonald, E. J., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1946**, 253-277.
104. Manley-Harris, M.; Richards, G. N., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1997**, 52, 207-239.
105. García-Moreno, M. I., *Molecules*, **2008**, 13, 1640-1670.
106. Defaye, J.; García Fernández, J. M., *Carbohydr. Res.*, **1994**, 256, C1-C4.
107. This, H., *Acc. Chem. Res.*, **2009b**, 42, 575-583.
108. Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M., *Top. Curr. Chem.*, **2010**, 294, 49-77.
109. Queneau, Y.; Jarosz, S.; Lewandowski, B.; Fitremann, J., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **2007**, Volume 61, 217-292.
110. Defaye, J.; Garcia Fernández, J. M., *Zuckerindustrie*, **1995**, 120, 700-704.
111. Defaye, J.; García Fernández, J. M., *Actual Chim Novembre*, **2000**, 24-27.
112. Oosterveld, A.; Voragen, A. G. J.; Schols, H. A., *Carbohydr. Polym.*, **2003**, 54, 183-192.
113. Montilla, A.; Ruiz-Matute, A. I.; Sanz, M. L.; Martínez-Castro, I.; del Castillo, M. D., *Food Research International*, **2006**, 39, 801-806.
114. Waleckx, E.; Gschaedler, A.; Colonna-Ceccaldi, B.; Monsan, P., *Food Chem.*, **2008**, 108, 40-48.
115. Shlubach, H. H.; Knoop, H., *Justus Liebigs Ann. Chem*, **1933**, 504, 19-30.
116. Uchiyama, T., *Agric. Biol. Chem*, **1983**, 47, 437-439.
117. Uchiyama, T., *Biochim. Biophys.*, **1973**, 315, 412-420.
118. Tanaka, K.; Uchiyama, T.; Ito, A., *Biochim. Biophys.*, **1972**, 284, 248-256.
119. Rechner, A. R.; Wagner, E.; Van Buren, L.; Van De Put, F.; Wiseman, S.; Rice-Evans, C. A., *Free Radic. Res.*, **2002**, 36, 1127-1135.
120. Saito, K.; Hira, T.; Suzuki, T.; Hara, H.; Yokota, A.; Tomita, F., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1999**, 63, 665-661.
121. Minamida, K.; Sujaya, I. N.; Tamura, A.; Shigematsu, N.; Sone, T.; Yokota, A.; Asano, K.; Benno, Y.; Tomita, F., *J. Biosci. Bioeng.*, **2004**, 98, 244-250.
122. Minamida, K.; Shiga, K.; Sujaya, I. N.; Sone, T.; Yokota, A.; Hara, H.; Asano, K.; Tomita, F., *J. Biosci. Bioeng.*, **2005a**, 99, 230-6.

123. Minamida, K.; Asakawa, C.; Sujaya, I. N.; Kaneko, M.; Abe, A.; Sone, T.; Hara, H.; Asano, K.; Tomita, F., *J. Biosci. Bioeng.*, **2006**, *101*, 149-56.
124. Minamida, K.; Kaneko, M.; Ohashi, M.; Sujaya, I. N.; Sone, T.; Wada, M.; Yokota, A.; Hara, H.; Asano, K.; Tomita, F., *J. Biosci. Bioeng.*, **2005b**, *99*, 548-54.
125. Hara, H.; Kondo, K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2005**, *69*, 839–841.
126. Mineo, H.; Amano, M.; Chiji, H.; Shigematsu, N.; Tomita, F.; Hara, H., *Dig. Dis. Sci.*, **2004**, *49*, 122–132.
127. Afsana, K.; Shiga, K.; Ishizuka, S.; Hara, H., *J. Nutr.*, **2003**, *133*, 3553–3560.
128. Shiga, K.; Hara, H.; Okano, G.; Ito, M.; Minami, A.; Tomita, F., *J. Nutr.*, **2003**, *133*, 4207–4211.
129. Mineo, H.; Hara, H.; Shigematsu, N.; Okuhara, Y.; Tomita, F., *J. Nutr.*, **2002**, *132*, 3394–3399.
130. Suzuki, T.; Hara, H., *Life Sci.*, **2006**, *79*, 401–410.
131. Matsumoto, M.; Matsukawa, N.; Chiji, H.; Hara, H., *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*, 4202-4206.
132. Kashimura, J.; Nakajima, Y.; Benno, Y.; Endo, K.; Mitsuoka, T., *Bifidobacteria and Microflora*, **1989**, *8*, 45-50.
133. Orban, J. I.; Patterson, J. A.; Sutton, A. L.; Richards, G. N., *Poultry sci.*, **1997**, *76*, 482-490.
134. Rubio Castillo, E. M.; Gomez-García, M.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Zarzuelo Zurita, A.; Gálvez Peralta, J. J.; Duval, R., *ES Patent WO2008107506 (A1)*. **2008**.
135. Peinado, M. J.; Echavarri, A.; Ruiz, R.; Suarez-Pereira, E.; Ortiz Mellet, C.; Garcia Fernandez, J. M.; Rubio, L. A., *Animal*, **2013**, *7*, 1779-88.
136. Golon, A.; Kuhnert, N., *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, *60*, 3266-74.
137. Sengar, G.; Sharma, H. K., *J. Food Sci. Technol.*, **2012**, *51*, 1686-96.
138. Real Decreto, *Real Decreto 348/2011, de 11 de marzo*, **2011**, *por el que se aprueba la norma de calidad para caramelos, chicles, confites y golosinas*.
139. (EFSA), *European Food Safety Authority* **2011**, *9*.
140. Cotton, R. H.; Rebers, P. A.; Cotton, J. E. R. H.; Rebers, P. A.; Maudru, J. E.; Rorabaugh, G., *Aust. J. Dairy Technol.*, **1955**, *12*, 3-20.
141. Tomasik, P.; Palasinski, M.; Wiejak, S., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1989**, *47*, 203–278.
142. Lee, G. C.; Lee, C. Y., *Food Chem.*, **1997**, *60*, 231–235.
143. Simkovis, I.; Surina, I.; Vrican, M., *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2003**, *70*, 493-504.
144. Antal, M. J.; Mok, W. S. L.; Richard, G. N., *Carbohydr. Res.*, **1990**, *199*, 91-109.

145. Manley-Harris, M.; Richards, G. N., *Carbohydr. Res.*, **1996**, 287, 183-202.
146. Defaye, J.; García Fernández, J. M., *Carbohydr. Res.*, **1994**, 251, 1-15.
147. Christian, T. J.; Manley-Harris, M.; Field, R. J.; Parker, B. A., *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 1823-1837.
148. Tanaka, M.; Nakajima, Y.; Nishio, K.; Hashimoto, H., *J. Carbohydr. Chem.*, **1993**, 12, 49-61.
149. Böhm, A.; Kaiser, I.; Trebstein, A.; Henle, T., *Eur. Food Res. Technol.*, **2005**, 220, 466-471.
150. Böhm, A.; Kleessen, B.; Henle, T., *Eur. Food Res. Technol.*, **2006**, 222, 737-740.
151. Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M., **2010**, 294, 49-77.
152. Suarez-Pereira, E.; Rubio, E. M.; Pilard, S.; Ortiz Mellet, C.; Garcia Fernandez, J. M., *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58, 1777-87.
153. Méndez-Ardoy, A.; Suárez-Pereira, E.; Balbuena Oliva, P.; Jiménez Blanco, J. L.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M., *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 517-528.
154. Okuhara, T., *Chem. Rev.*, **2012**, 102, 3641-3666.
155. Thompson-Chagoyán, O. C.; Maldonado, J.; Gil, A., *Clin. Nutr.*, **2005**, 24, 339-352.
156. Xavier, R. J.; Podolsky, D. K., *Nature*, **2007**, 448, 427-434.
157. Looijer-van Langen, M. A. C.; Dieleman, L. A., *Inflammatory bowel diseases*, **2009**, 15, 454-462.
158. Arribas, B.; Suárez-Pereira, E.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Buttersack, C.; Rodríguez-Cabezas, M. E.; Garrido-Mesa, N.; Bailon, E.; Guerra-Hernández, E.; Zarzuelo, A.; Gálvez, J., *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58, 6476-6484.
159. Rubio, L. A.; Peinado, M. J.; Echávarri, A.; Ruiz, R.; Suárez-Pereira, E.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M., *Adv. Microbiol.*, **2014**, 4, 242-251.

2. OBJETIVOS GENERALES

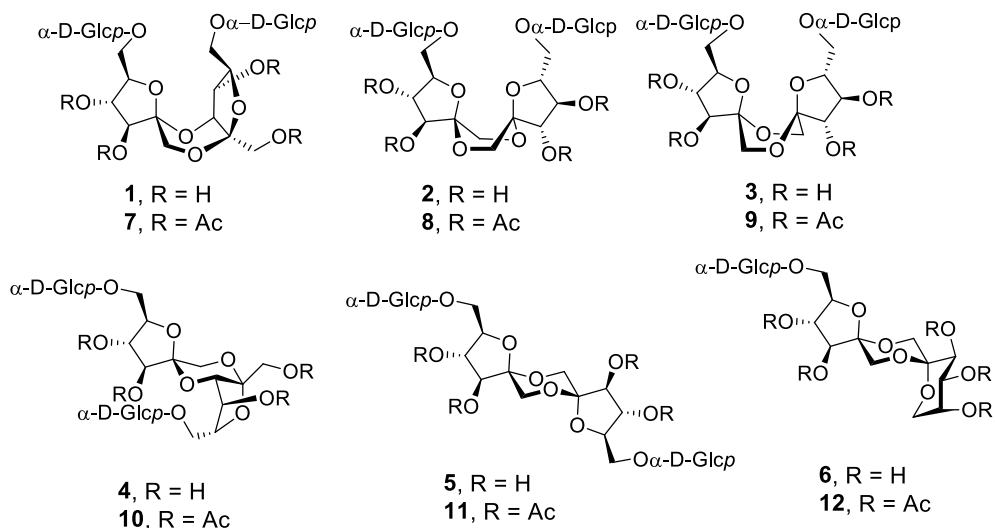


A la vista de los antecedentes comentados, en esta Tesis nos planteamos las siguientes tareas y objetivos:

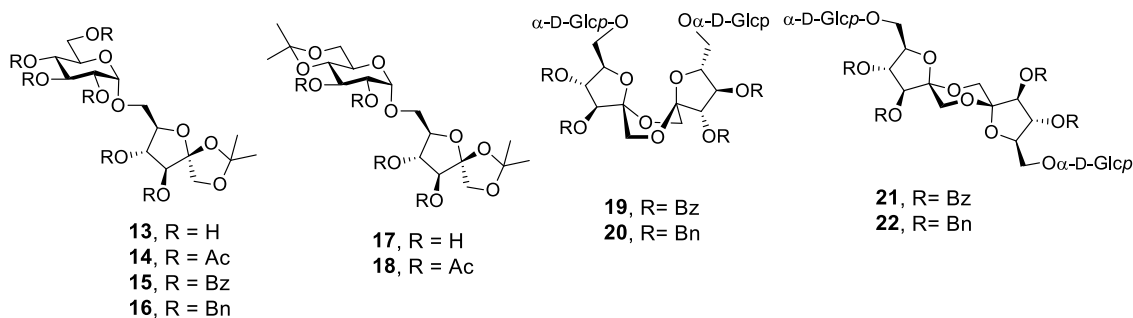
- Preparación de DAFs derivados de Palatinosa[®] en forma diastereoisoméricamente pura para su utilización como patrones analíticos.
- Puesta a punto de métodos analíticos basados en la cromatografía de gases y la cromatografía iónica para la detección cualitativa y cuantitativa de los DAFs derivados de Palatinosa[®].
- Optimización y escalado de la preparación de caramelos enriquecidos en DAFs y glicosil-DAFs mediante caramelización de la Palatinosa[®] comercial empleando condiciones heterogéneas.
- Extensión de la metodología de caramelización en condiciones heterogéneas a la D-glucosa y la D-manosa: preparación de productos enriquecidos en glucooligosacáridos tipo povidex y manooligosacáridos.
- Desarrollo de un procedimiento de preparación de DAFs derivados de D-fructosa y Palatinosa[®] empleando dióxido de carbono como catalizador.
- Desarrollo de un método de preparación de DAFs derivados de la D-glucosa y Palatinosa[®] empleando irradiación con microondas.

Las estructuras de los nuevos compuestos y patrones preparados en el curso de este trabajo y de los correspondientes precursores se detallan a continuación:

- **Dianhidridos de Palatinosa[®] obtenidos por reacción HF:piridina**



- **Síntesis estereoselectiva de dianhidridos de Palatinosa[®]**



3. REACCIÓN DE CARMELIZACIÓN DE PALATINOSA[®] .EMPLEANDO
CATALIZADORES HETEROGÉNEOS Y ACTIVACIÓN MEDIANTE
IRRADIACIÓN POR MICROONDAS



3. Reacción de caramelización de Palatinosa® empleando catalizadores heterogéneos y activación mediante irradiación por microondas

En general los alimentos convencionales contienen proporciones variables de hidratos de carbono como almidón procesado, glucosa, jarabes de glucosa, maltodextrinas o sacarosa, entre otros. Los fabricantes de alimentos tienen la posibilidad de modificar el impacto glicémico de estos alimentos mediante la sustitución de estos azúcares convencionales por otros con bajo índice glicémico de los que la isomaltulosa (Palatinosa®) es un buen ejemplo.¹ El estudio de la caramelización de la Palatinosa® es el objeto central de este capítulo.

3.1. La Palatinosa® y los condensados de Palatinosa®

La Palatinosa® (isomaltulosa, 6-*O*- α -D-glucopiranosil-D-fructofuranosa) es un disacárido reductor e isómero estructural de la sacarosa. Se obtiene por transposición enzimática de la sacarosa por la acción de α -glucosiltransferasas de diferentes microorganismos, tales como *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia sp.*, *Klebsiella planticola*, *Serratia* y otros.² Se viene utilizando como edulcorante en Japón desde 1985. Es un compuesto de origen natural que se encuentra en la miel o en el jugo de caña de azúcar y en productos derivados tales como jarabe de melaza. Su poder edulcorante es aproximadamente la mitad que el de la sacarosa.³ Este disacárido es adecuado para su incorporación en dietas nutritivas que requieren de la absorción lenta de la glucosa. Se trata de un producto no cariogénico e indicado para su consumo por diabéticos y prediabéticos. Los productos que contienen isomaltulosa presentan el mismo aspecto y textura que los hechos con azúcar tradicional y su consumo no aumenta significativamente la glucosa en sangre o los niveles de insulina.³⁻⁴

Estudios nutricionales han demostrado que la Palatinosa® disminuye la absorción de glucosa en la sangre⁵ y permite la elaboración de alimentos con bajo índice glicémico (IG). El IG de la isomaltulosa es de 32, el de la sacarosa 65 y el de la glucosa 100. A

modo de ejemplo, un desayuno con bajo IG utilizando Palatinosa® en lugar de glucosa mantiene el rendimiento a lo largo de la mañana y un buen estado de ánimo.⁶

En un estudio in vivo, Tonouchi y col.⁷ mostraron que la dosis de Palatinosa® y sacarosa determinaban claramente la respuesta glicémica de cada azúcar y su biodisponibilidad en la sangre siendo más lenta la velocidad de hidrólisis de la Palatinosa® que la de la sacarosa en el intestino delgado en las ratas.⁷

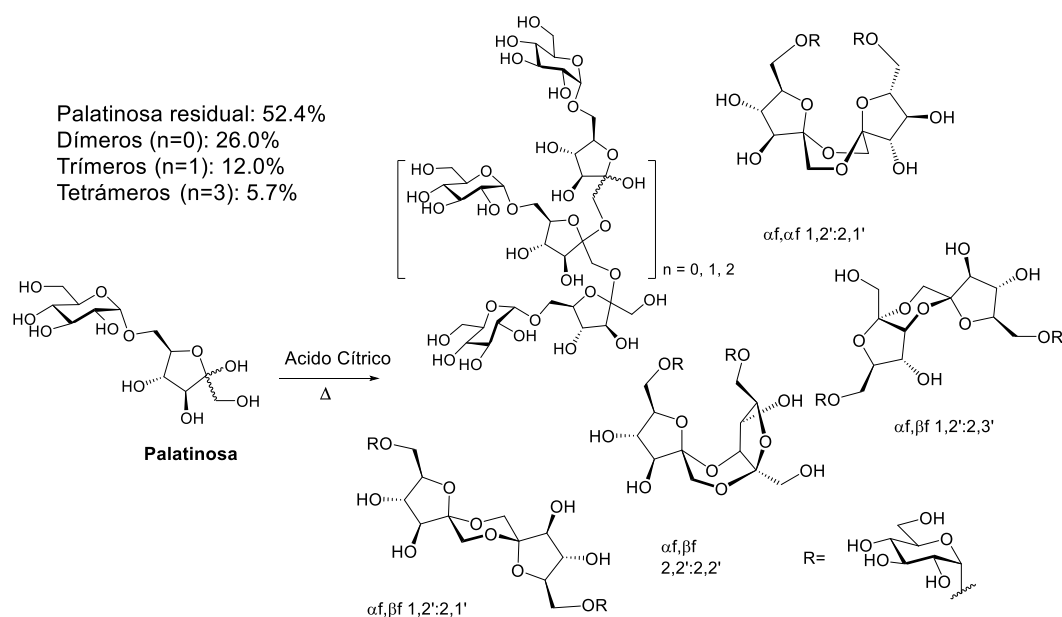
La Palatinosa® es un buen sustituyente del azúcar en los caramelos sin azúcar, chocolate, cereales y productos horneados. En la nutrición deportista el consumo de Palatinosa® proporciona una energía sostenible y un aumento de la oxidación de grasas. Además, mejora la estabilidad de las bebidas y reduce la acidez de manera más efectiva que la sacarosa. Este aspecto es muy relevante en el caso de las bebidas deportivas isotónicas que tienden a tener un pH menor de 3.

La Palatinosa® muestra muy baja higroscopicidad a temperatura ambiente y con índices de humedad relativa de hasta el 85%. Es, por tanto, un ingrediente perfecto para uso en forma de polvo. Incluso muestra una absorción de agua reducida en mezclas con otros azúcares, minimizando significativamente el riesgo de apelmazamiento y la formación de grumos. También aporta mayor vida útil a glaseados y productos horneados. Debido a la diferencia en la actividad del agua, la superficie de los productos glaseados tiende a secarse y el esmalte en la parte superior se vuelve pegajoso con el tiempo. Con la adición de Palatinosa® la masa mantiene su suavidad y frescura original dejando un esmalte no pegajoso y una vida útil más larga al producto envasado.

Kashimura y col. han descrito que la incorporación de isomaltulosa en la dieta de adultos de mediana edad favorece la capacidad de concentración en una tarea matemática⁸. Por otra parte, dietas con baja carga glicémica conteniendo Palatinosa® han mostrado beneficios en la población infantil.^{9,10} Taib y col. estudiaron los efectos positivos de la

adición de isomaltulosa a la leche de crecimiento.¹¹ Sato y col. encontraron que las dietas que contenían Palatinosa® y ácido oleico podían prevenir alteraciones metabólicas inducidas por la dieta y eran adecuadas para la prevención y el tratamiento de la obesidad y sus complicaciones.¹²

La pirólisis de la Palatinosa® con ácido cítrico origina los condensados de Palatinosa (Esquema 3.1).¹³ Se ha descrito que estos condensados, que contienen glicosil-DAFs, presentan propiedades prebióticas y beneficios en la flora intestinal (aumento de bifidobacterias) en humanos y animales.^{3,14}



Esquema 3.1. Estructura de los condensados de Palatinosa® preparados mediante pirólisis con ácido cítrico.

La transformación de la Palatinosa® en condensados de Palatinosa® potencia de manera relevante las propiedades nutricionales favorables, reduciendo la digestibilidad en el tracto digestivo. El consumo de condensados de Palatinosa® ayuda a prevenir y/o combatir enfermedades infecciosas y enfermedades intestinales inflamatorias crónicas,

así como el carcinoma de colon. Además mejora el sistema de defensa inmune y previene el estrés oxidativo al aumentar la actividad de glutatión S-transferasa y el contenido de glutatión, que actúa como antioxidante. También se ha observado, que la población de bifidobacterias se incrementa, acorde con una actividad prebiótica favorable, lo que apoya su uso para la prevención de enfermedades.¹⁵

En esta tesis nos planteamos el desarrollo de nuevos métodos de condensación de la Palatinosa[®] que permitan aumentar la proporción de estos glicosil-DAFs. En concreto, hemos abordado el estudio de la caramelización de la Palatinosa[®] promovida por catalizadores ácidos heterogéneos y la activación por microondas (MW). Previamente, y con objeto de disponer de patrones adecuados para estudios analíticos, hemos abordado la preparación de dianhidridos de Palatinosa[®] en forma diastereoméricamente pura. Los antecedentes sobre este tipo de compuestos y su síntesis se comentan a continuación.

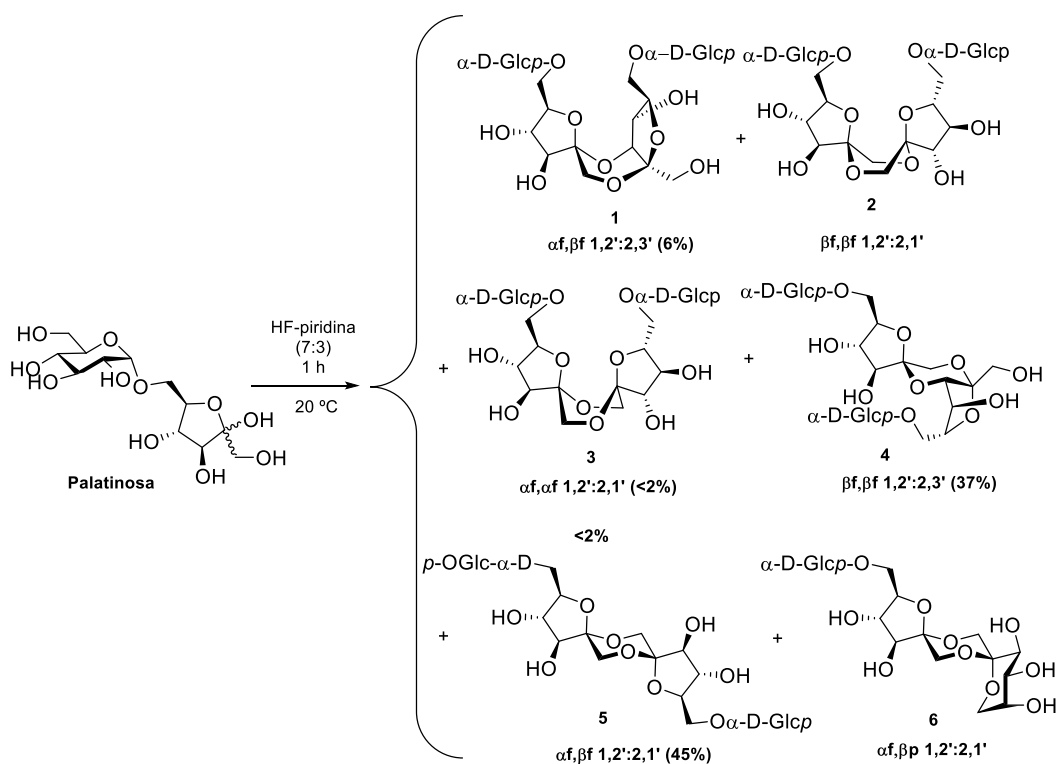
3.2. Preparación de dianhidridos de Palatinosa[®] por activación con fluoruro de hidrógeno (HF) o fluoruro de poli(fluoruro de hidrógeno)piridinio (HF-piridina)

La activación protónica de la D-fructosa, la sacarosa, los FOS, la inulina o glucosilfructosas como la palatinosa y la leucrosa, en presencia de HF (anhidro o complejoado con piridina) constituye un procedimiento muy eficaz para la preparación de algunos DAFs y sus derivados glicosilados.¹⁶⁻¹⁸

La acción del HF sobre la Palatinosa[®], la maltulosa (4-*O*- α -D-glucopiranosil-D-fructosa), la leucrosa (5-*O*- α -D-glucopiranosil-D-fructopiranososa) o la turanosa (3-*O*- α -D-glucopiranosil-D-fructosa) da lugar a diferentes pseudotetrasacáridos con un núcleo central de DAF glucosilado. La naturaleza y el número de estos tetrasacáridos dependen del disacárido utilizado en la reacción de activación protónica. Por ejemplo, la Palatinosa origina mayormente en estas condiciones DAFs difuranosídicos glucosilados en las

posiciones primarias. Las proporciones de compuestos formados puede modularse de manera más adecuada usando diferentes proporciones de HF:piridina.¹⁷

Previamente al estudio de caramelización de la Palatinosa®, y con objeto de poner a punto el método analítico correspondiente, se procedió a la preparación de productos enriquecidos en dianhidridos de Palatinosa® utilizando el método de activación con el complejo poli(flúoruro de hidrógeno)piridinio (7:3) durante 1 hora a 20 °C. De acuerdo con la bibliografía,¹⁷ se obtuvo así una mezcla de glicosil-DAFs en la que predominan las estructuras pseudotetrasacarídicas que contienen subunidades furanosídicas **1-5** (Esquema 3.2).



Esquema 3.2. Productos formados por la acción del complejo HF-piridina (7:3) sobre la Palatinosa® durante 1h a 20 °C.

La composición de la mezcla de dianhidridos de Palatinosa[®] isoméricos se estudió en primer lugar por espectroscopía de ^{13}C RMN. Los desplazamientos químicos de los carbonos anoméric C-2 y C-2' son característicos para cada dianhidrido de Palatinosa[®] y constituyen una “huella” que permite su identificación. Dado que el entorno químico que rodea a estos centros acetálicos es similar en los diferentes DAFs, a partir de las intensidades de las señales es incluso posible realizar una estimación de las proporciones relativas, al menos para los componentes mayoritarios, sin necesidad de derivatización de la muestra.

En la Figura 3.1 se muestra el espectro de ^{13}C RMN del crudo de reacción, registrado a 125.7 MHz en D_2O con tiempos de adquisición muy largos y que confirma la presencia de los glicosil-DAFs **1**, **3**, **4** y **5** (Esquema 3.2.). A partir de las áreas de las señales se pudo estimar las proporciones relativas de los diferentes componentes, siendo mayoritario el compuesto **5**, seguido del **4** y en menor proporción el **3**. Sin embargo, esta reacción no permitió el aislamiento de patrones puros. Las proporciones relativas obtenidas a partir de las áreas de las señales se recogen en la Tabla 3.1.

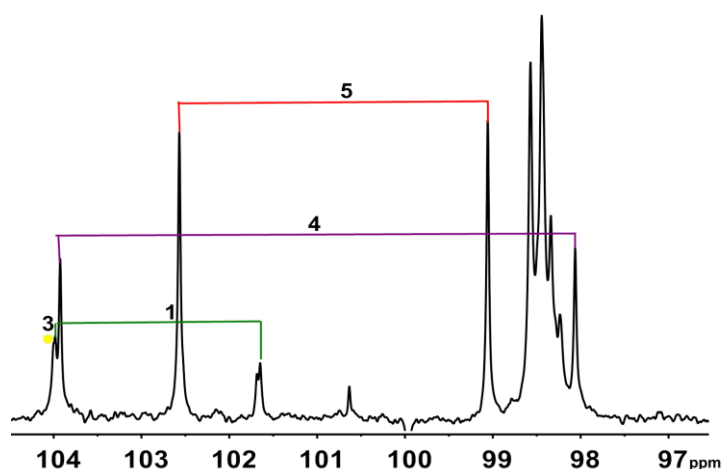


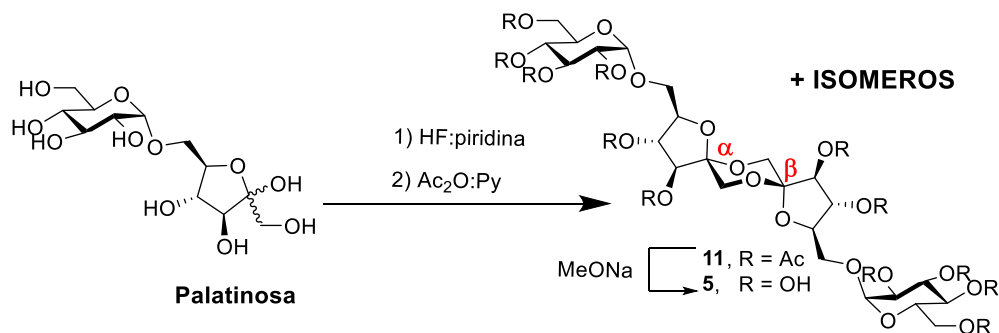
Figura 3.1. Espectro de ^{13}C RMN (125.7 MHz, D_2O) de la mezcla de reacción de la Palatinosa[®] a 20°C con HF-piridina (7:3) durante 60 min.

Tabla 3.1. Composición de la mezcla de dianhidridos de Palatinosa[®] obtenida por reacción con HF-Piridina.

Compuesto	Estructura	Proporción (%)
1	$\alpha f, \beta f$ 1,2':2,3'	12
2	$\beta f, \beta f$ 1,2':2,1'	^a
3	$\alpha f, \alpha f$ 1,2':2,1'	4
4	$\beta f, \beta f$ 1,2':2,3'	32
5	$\alpha f, \beta f$ 1,2':2,1'	52

^a No identificado en el espectro de ^{13}C RMN, pero detectado en el cromatograma (GC-FID)

La acetilación de la mezcla de reacción obtenida por tratamiento de la Palatinosa[®] con HF-piridina y su posterior cristalización de EtOH 96% permitió obtener el derivado peracetilado del dianhidrido de Palatinosa[®] **11** en forma pura (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Su estructura se confirmó mediante los espectros de ^1H y ^{13}C RMN. El espectro de protones (Figura 3.2) es consistente con la falta de simetría de la molécula, presentando solapamiento de señales. En la región de los carbonos anómicos del espectro de ^{13}C RMN (Figura 3.2) se observan las señales para las unidades α y β de fructofuranosa (C-2f y C-2f'), con un δ entre 99-102 ppm y una única señal para los C-1g de las unidades de glucosa, con un δ de 96 ppm



Esquema 3.3. Preparación del compuesto acetilado **11** ($\alpha f, \beta f$ 1,2':2,1').

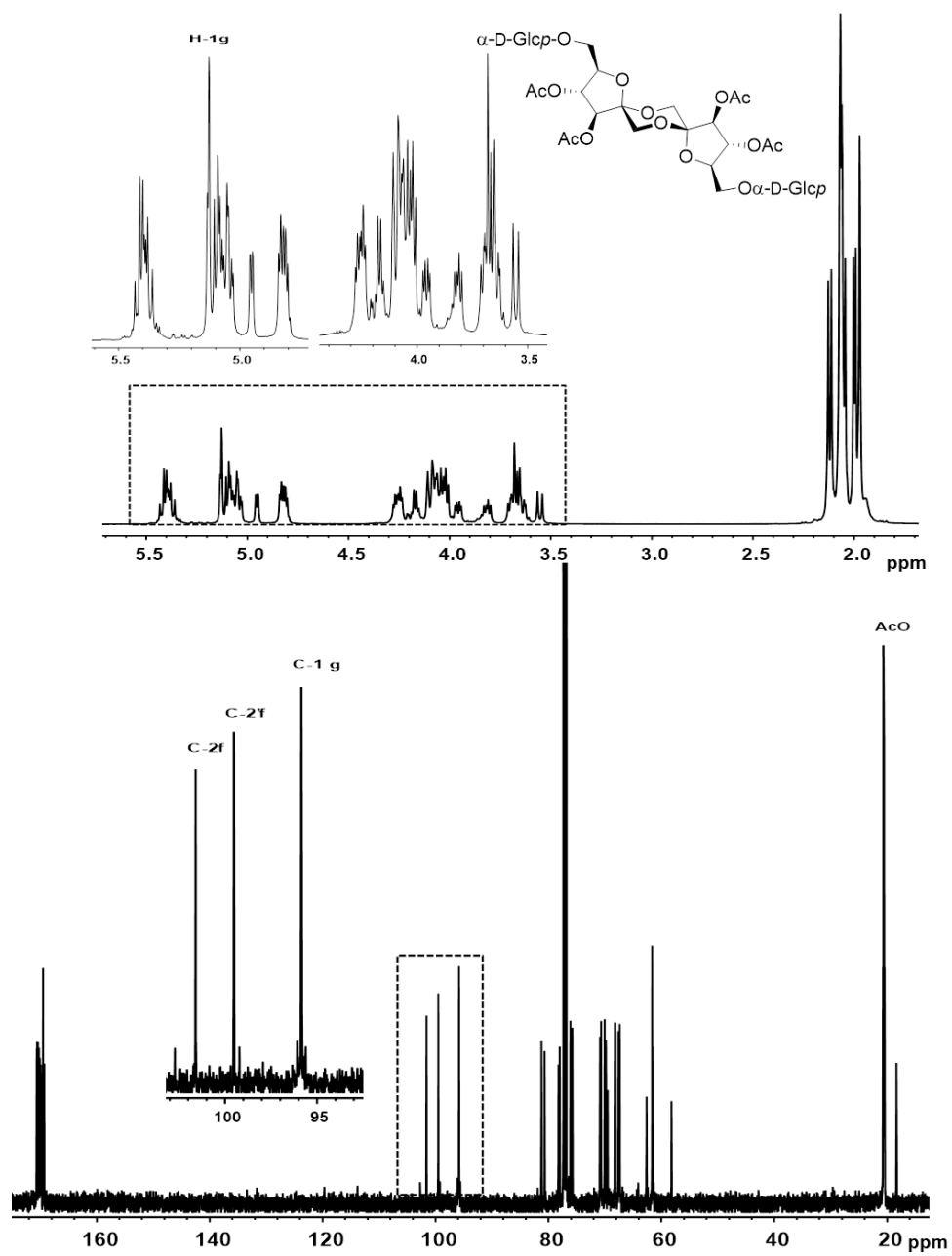


Figura 3.2. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl_3) de **11**.

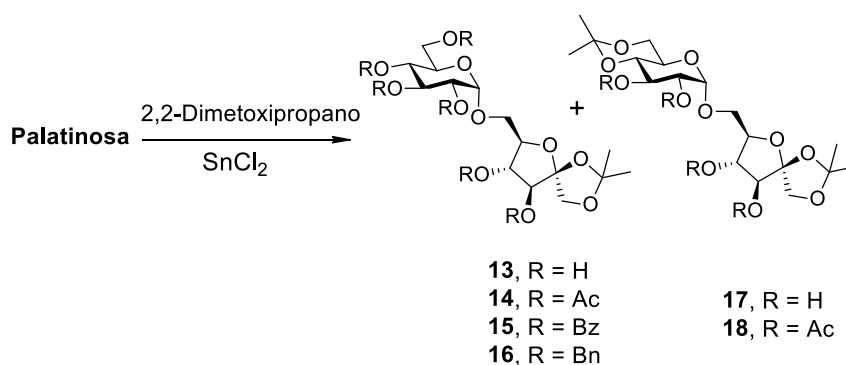
La desacetilación convencional del producto cristalizado permitió obtener el dianhidrido **5** y un derivado trisacárido con estructura de 6-O- α -D-glucopiranosil- α -D-fructofuranosa β -D-fructopiranososa 1,2':2,1'-dianhidrido, de acuerdo con el procedimiento descrito en la bibliografía¹⁷. Desafortunadamente, intentos de obtener otros patrones puros fueron infructuosos por lo que nos planteamos el desarrollo de métodos de síntesis estereoselectiva de dianhidridos de Palatinosa[®].

3.3. Síntesis estereoselectiva de dianhidridos de Palatinosa[®]

Nuestra aproximación sintética exige la preparación de derivados de Palatinosa[®] adecuados, que puedan generar la estructura mono o diespiroacetálica típica de los DAFs, como precursores claves. En trabajos anteriores del grupo de investigación se había descrito que la activación de derivados de fructosa portando un grupo isopropilideno en las posiciones O1 y O2 con ácido triflorometanosulfónico (ácido triflico, TfOH), permitía acceder a dianhidridos de fructosa. El curso estereoquímico de la reacción depende de la naturaleza de los grupos protectores sobre el resto de los hidroxilos, en particular de su carácter participante o no participante, proporcionando un método adecuado para acceder a diferentes isómeros de DAFs.¹⁹ A la vista de estos antecedentes, en esta Tesis nos hemos planteado la extensión de la estrategia a la síntesis de dianhidridos de Palatinosa[®].

Para la isopropilidenación de la Palatinosa[®] (Esquema 3.4.) se trató el azúcar libre con 2,2-dimetoxipropano y una cantidad catalítica de dicloruro de estaño¹⁹. Tras 24 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se neutralizó con piridina y se purificó por cromatografía en columna (EtOAc-EtOH-H₂O 45:10:3), obteniéndose el derivado 1,2-O-isopropilideno de configuración β **13** como producto mayoritario (61%) y el derivado 1,2:4',6'-di-O-isopropilideno **17** como producto minoritario (24%). Los espectros de RMN y EM-ESI, así como los datos de análisis elemental, demostraron inequívocamente la estructura de estos compuestos. En los espectros de ¹H RMN de las Figuras 3.3. y 3.4.,

se observan dos singuletes característicos del grupo isopropilideno a δ 1.45-1.34 ppm en el caso de **13** y cuatro singuletes a δ entre 1.57-1.44 ppm en el caso de **17**. Asimismo, en el espectro de ^{13}C RMN de **13** se identifican dos señales para los metilos del grupo CMe_2 con δ 26.1 y 24.77 ppm, mientras que en el espectro de ^{13}C RMN para **17**, se observan cuatro señales para grupos metilo con δ en el rango 27.9-18.4 ppm. En ambos casos se observan también las señales para los carbonos anoméricos de la fructosa (C-2f) y de la glucosa (C-1g).



Esquema 3.4. Síntesis de derivados acetalados de Palatinosa[®]. Reactivos y condiciones: **13/17**, dimetoxipropano, SnCl_2 , dioxano, t.a., 24 h, 61-24%; **14**, Piridina- Ac_2O , t.a., 24 h, 89%; **15**, BzCl-Py , t.a., 18 h, DCM, 65%; **16**, NaH, BrBn, DMF, t.a., 3 h, 66%.

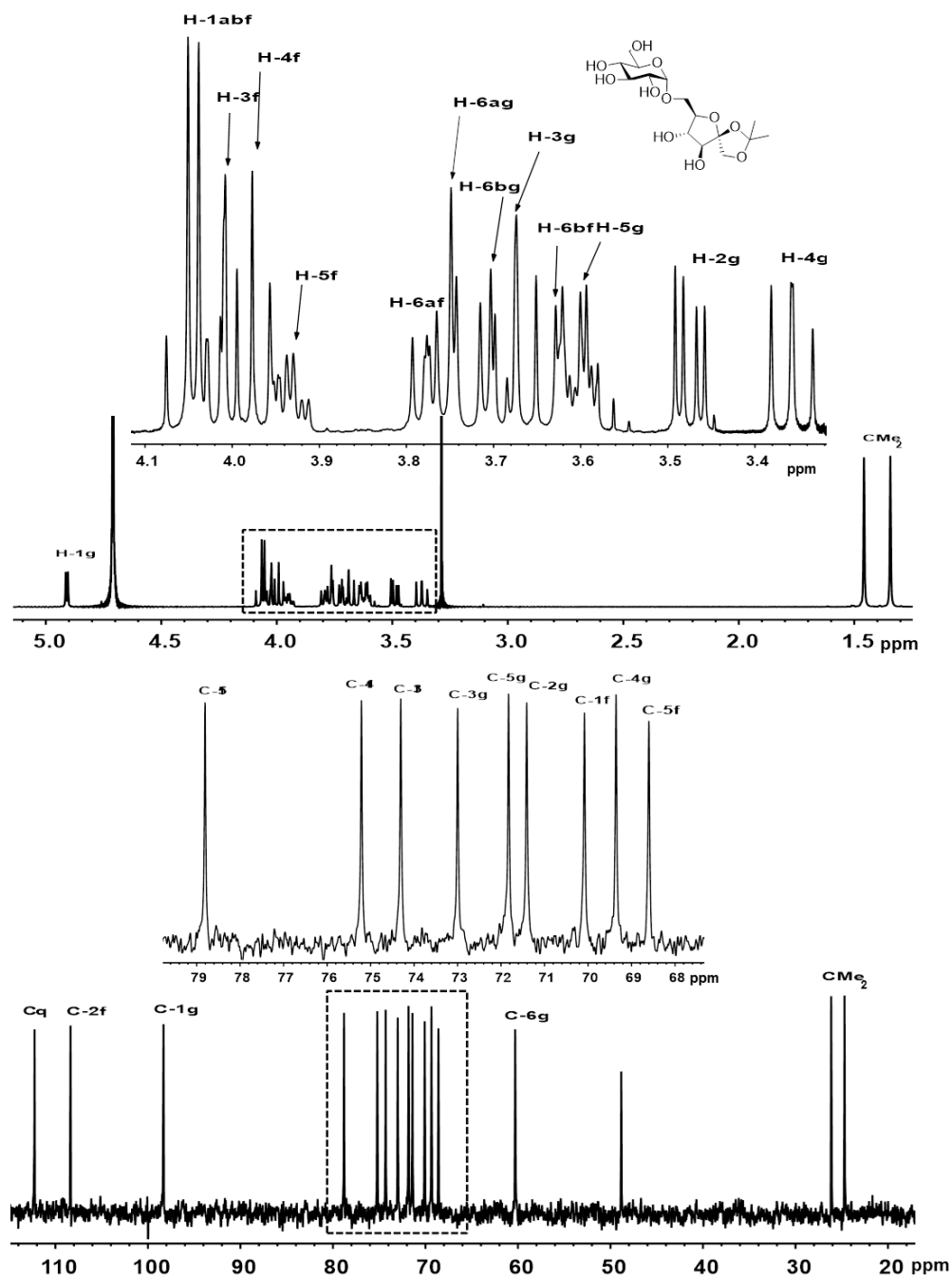


Figura 3.3. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, D_2O) de **13**.

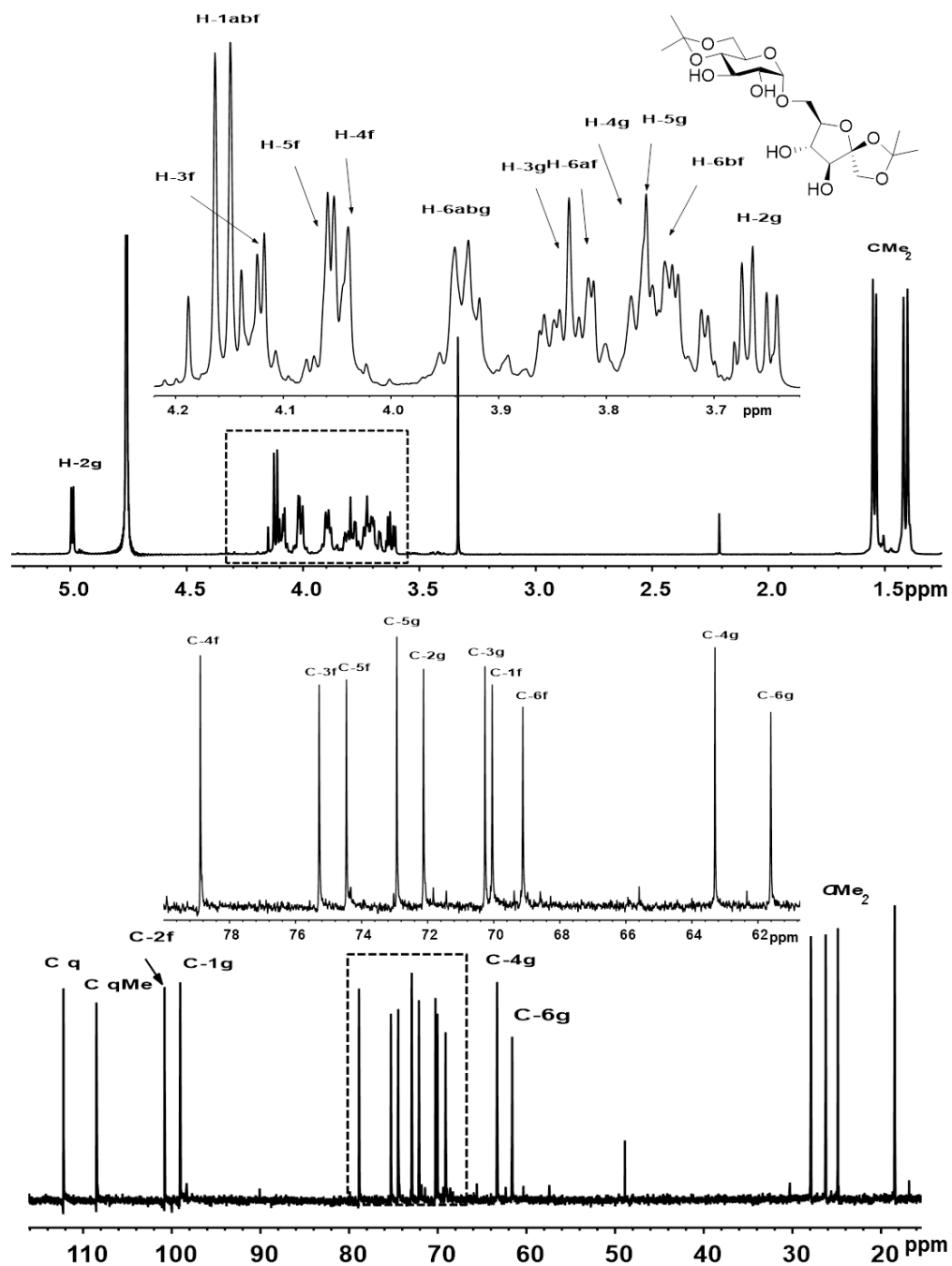


Figura 3.4. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, D_2O) de **17**.

Los grupos hidroxilos de **13** se transformaron a continuación en acetato, benzoato y éster bencílico. Así, la acetilación convencional de **13** condujo a la 3,4,2',3',4',6'-hexa-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden- α -palatinosa (**14**), con un rendimiento del 89%, y la reacción con cloruro de benzoilo en piridina condujo al derivado 3,4,2',3',4',6'-hexa-*O*-benzoil-1,2-*O*-isopropiliden- α -palatinosa (**15**) que se aisló con un rendimiento del 65%. Para la preparación del derivado bencilado, 3,4,2',3',4',6'-hexa-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropiliden- α -palatinosa (**16**), una disolución de **13** en DMF se trató con hidruro de sodio (NaH) y bromuro de bencilo, durante 3 h a temperatura ambiente. Tras purificación por cromatografía en columna (EtOAc-éter de petróleo 1:6) se obtuvo **16** con un rendimiento del 66%.

Las estructuras de **14**, **15** y **16** se confirmaron mediante los espectros de EM-ESI, ^1H y ^{13}C RMN. A modo de ejemplo, en los espectros de ^1H RMN de **15** y **16** se observa los singuletes para los metilos del grupo isopropilideno a δ 1.57 y 1.21 / 1.55 y 1.52 ppm, respectivamente. El protón anomérico de la unidad de la glucosa de configuración α (H-1g) resuena a 5.54 ppm, con una constante de acoplamiento $J_{1,2}$ de 3.7 Hz, en el caso de **15** y a 4.97 ppm, con una constante de acoplamiento $J_{1,2}$ de 3.5 Hz, en el caso de **16**. Por su parte, en los espectros de ^{13}C RMN se identifican las señales de los metilos de isopropilideno a δ 26.2 y 26.0 / 26.7 y 26.3 ppm y la correspondiente señal para el carbono cuaternario del mismo grupo a δ 105 / 106 ppm. Los espectros bidimensionales HMQC y COSY permitieron asignar el resto de las señales en los espectros (Figuras 3.5 y 3.6).

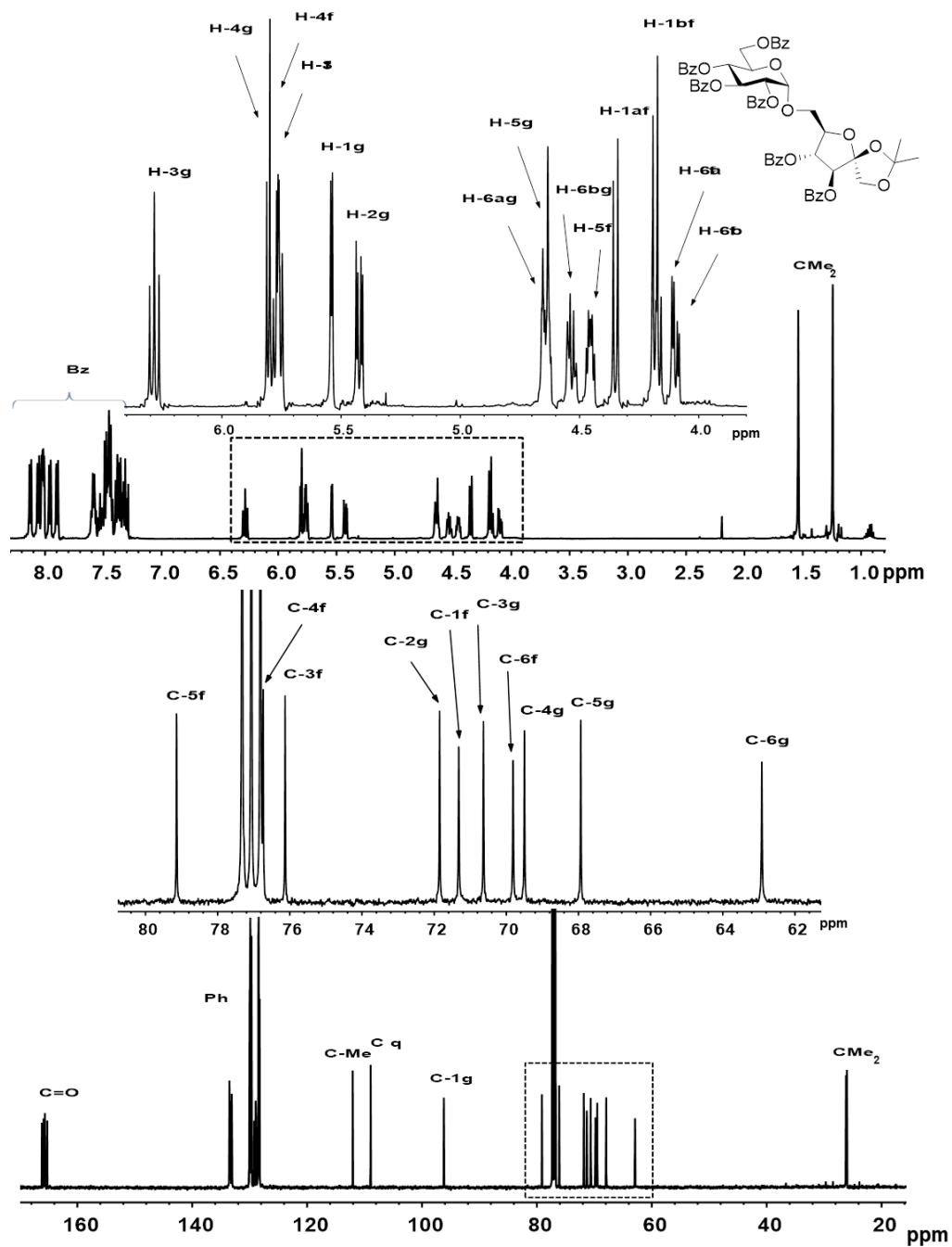


Figura 3.5. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl₃) de **15**.

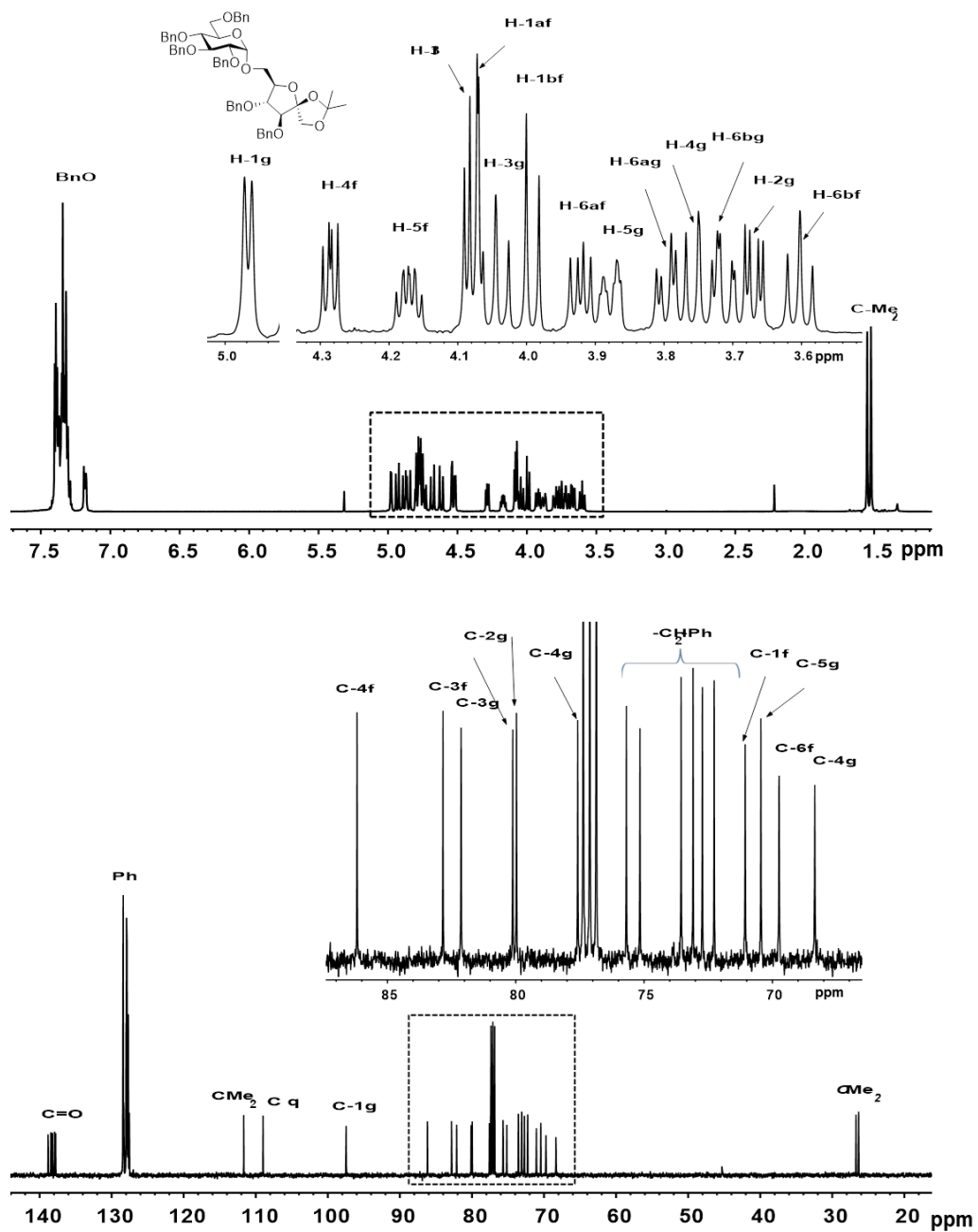
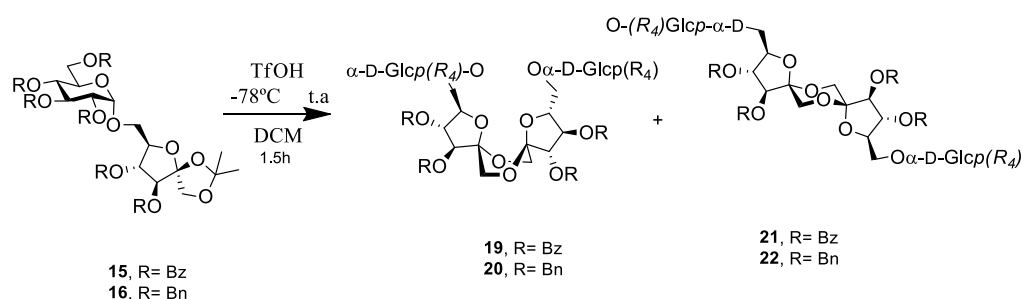


Figura 3.6. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl_3) de 16.

Resultados previos del grupo de investigación indicaban que la espiroacetalación de la 1,2-*O*-isopropiliden-3,4,5-tri-*O*-bencil- β -D-fructofuranosa, empleando TfOH, conducía a una mezcla de DAFs dipiranosídicos con configuraciones anoméricas α,β en proporción 1:20, en tanto que la sustitución de los grupos bencilos por grupos benzoilos invertía la selectividad, proporcionando mayoritariamente el isómero β,β .¹⁶ En nuestro caso (Esquema 3.5), el tratamiento del compuesto perbenzoilado **15**, con ácido trifílico en DCM a -78 °C, bajo atmosfera de Ar, proporcionó los glicosil-DAFs **19** y **21** en proporción 22:1, con un rendimiento global del 67% mientras que partiendo del derivado perbencilado **16**, se obtuvo una mezcla de los dianhidridos de Palatinosa® **20** y **22** en proporción 1:19, con un rendimiento del 60%. Los compuestos **19-22** se aislaron en forma pura después de purificación por cromatografía en columna.



Esquema 3.5. Síntesis estereoselectiva de dianhidridos de Palatinosa® a partir de 3,4,2',3',4',6'-hexa-*O*-benzoil/bencil-1,2-*O*-isopropiliden- β -palatinosa (**15**, **16**).

La simetría de los compuestos **19** y **20** queda confirmada en los correspondientes espectros de ^1H y ^{13}C RMN (Figuras 3.7 y 3.9). En el compuesto benzoilado **19**, se observa la señal de H-3f como un doblete con una $J_{3,4}$ de 2.4 Hz y el protón anómico de la unidad de glucosa H-1g se observa como un doblete con $J_{1,2}$ de 3.7 Hz. En el espectro del ^{13}C RMN, los carbonos anoméricos C-2f se observan a δ 103.3 y 96.4 ppm, respectivamente (Figuras 3.7 y 3.9).

En las figuras 3.8 y 3.10 se recogen los espectros ^1H y ^{13}C RMN de los dianhidridos asimétricos, **20** y **22**. En los espectros de ^1H RMN se observan señales para los protones anoméricos H-1g y H-1g', como dobletes con δ a 5.42 y 5.41 ppm para **20** y a 4.90 y 4.87 ppm para **22**. En los espectros de ^{13}C RMN, y en la región de los carbonos anoméricos se identifican las señales para las unidades α y β de fructofurancosa (C-2f y C-2f') y las unidades de glucosa (C-1g y C-1g').

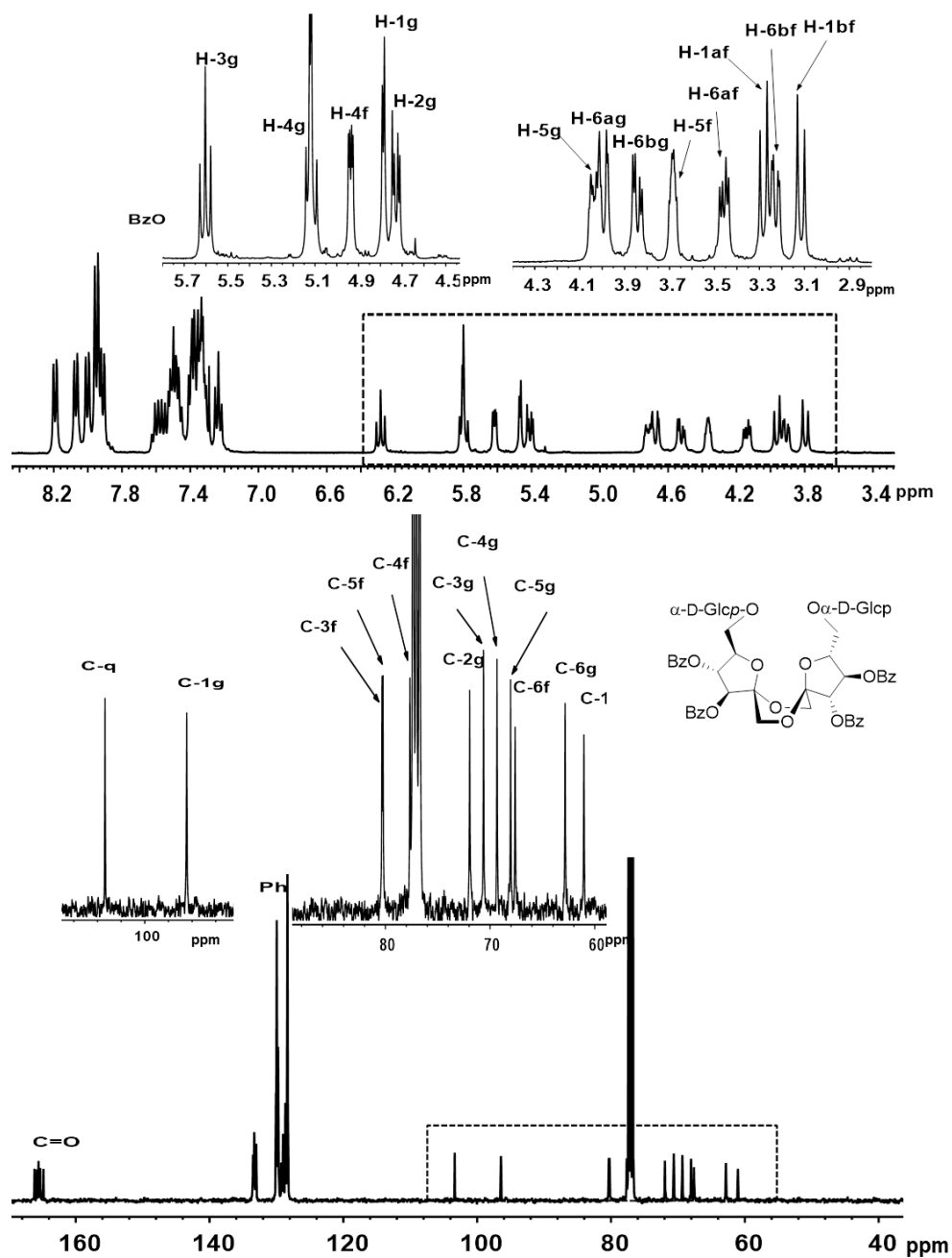


Figura 3.7. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl_3) de **19**.

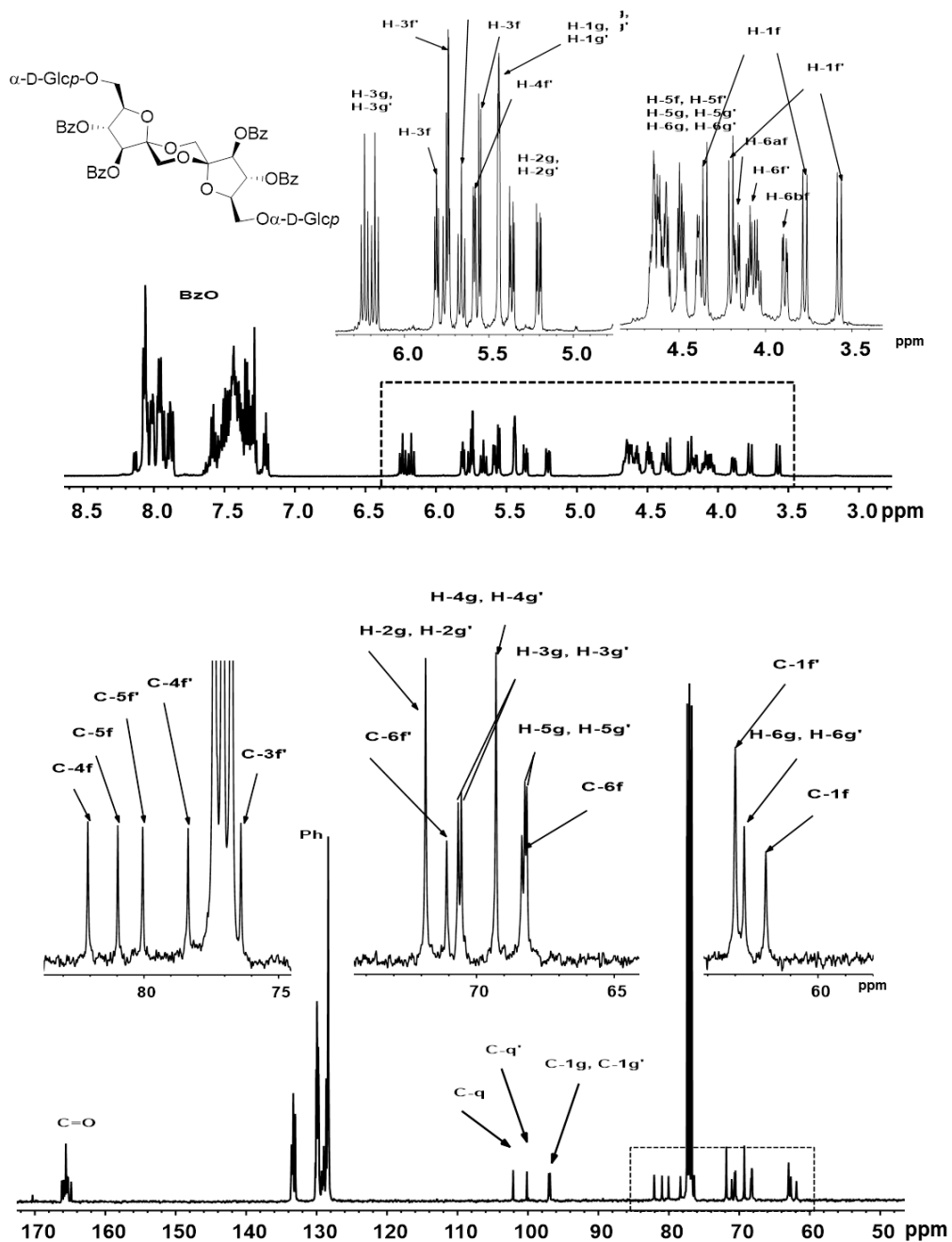


Figura 3.8. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl_3) de 20.

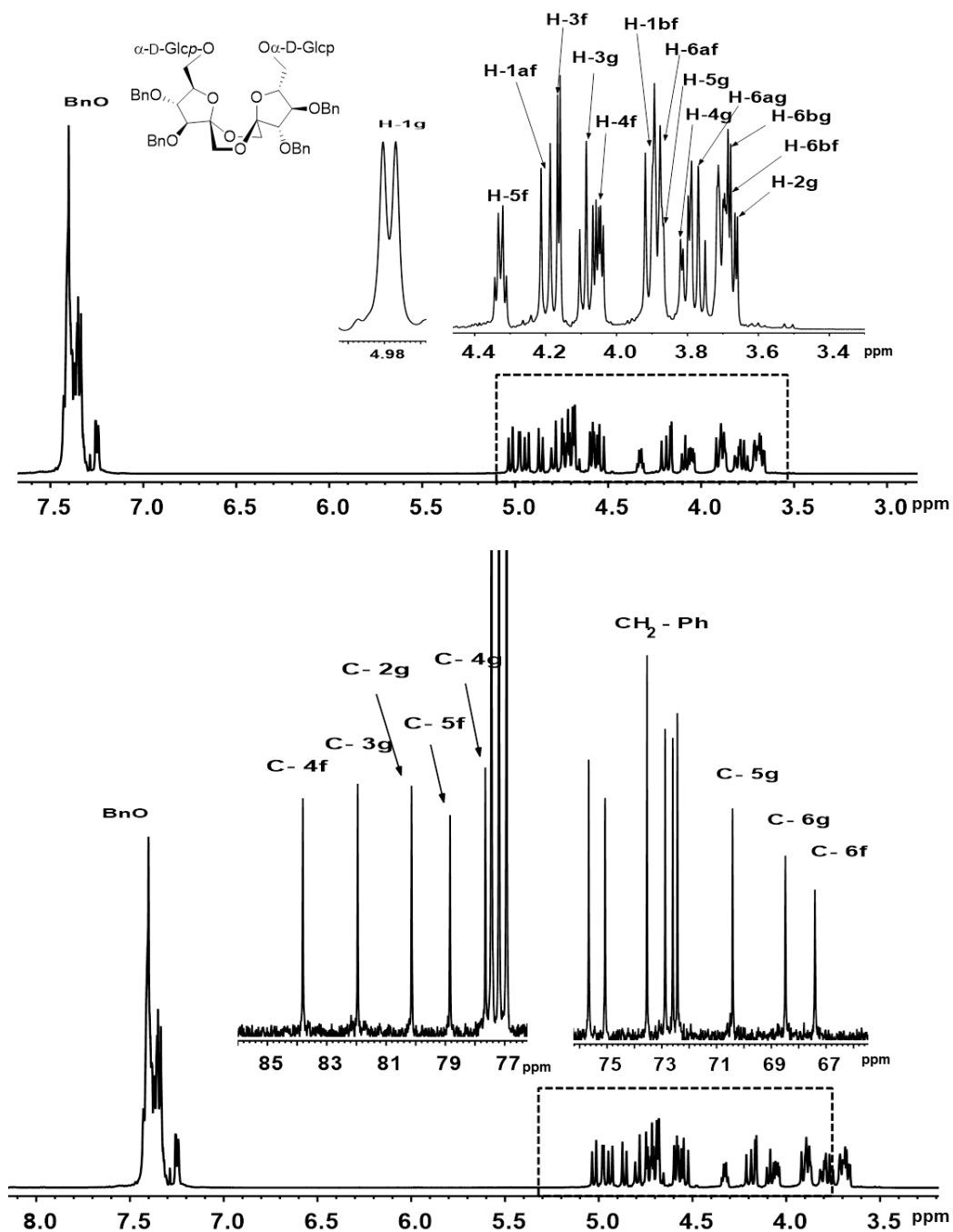


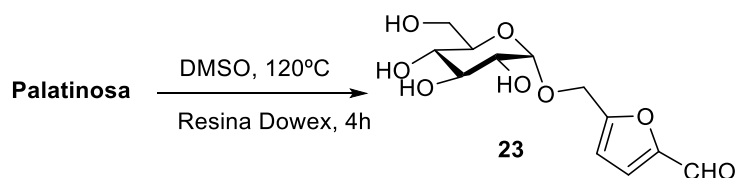
Figura 3.9. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl_3) de **21**.



Figura 3.10. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, CDCl_3) de **22**.

Durante la caramelización de la fructosa se genera una fracción volátil en la que el componente mayoritario es el hidroximetilfurfural (HMF). Análogamente, durante la caramelización de la Palatinosa[®] la deshidratación en condiciones acuosas conduce a la formación del 5- α -D-glucopiranosiloximetilfurfural (G-HMF). Es importante señalar que G-HMF y algunos de sus análogos se encuentran en diferentes productos naturales, alimentos y plantas, como *radix rehmanniae recens*, el núcleo de *Prinsepia uniflora*, el fruto de *Amelanchier canadensis*, en el caramelo comercial y en dulces de caramelo.²⁰ Puesto que cabe esperar la formación de G-HMF (**23**) en los procesos de caramelización de la Palatinosa[®], en esta Tesis hemos abordado también su síntesis con objeto de disponer de un patrón puro.

El compuesto **23** se ha preparado por tratamiento de una disolución de Palatinosa[®] en DMSO, con resina Dowex, a 120 °C durante 4 h (Esquema 3.6.), siguiendo el procedimiento descrito por Lichtenthaler y Kunz.²¹ El producto se purificó por cromatografía en columna (EtOAc–EtOH–H₂O 45:5:3) aislándose con un rendimiento del 67%. Los datos quimicofísicos coinciden con los descritos en la bibliografía. En la Figura 3.11 se muestra el espectro de ¹H RMN, en el que se observa un doblete característico para el protón anomérico de la glucosa con un δ de 4,96 ppm. En el espectro de ¹³C RMN se identifican las señales para la unidad de furfural y para la unidad de azúcar de manera inequívoca.



Esquema 3.6. Preparación del 5- α -D-glucosiloximetilfurfural (G-HMF) a partir de Palatinosa[®].

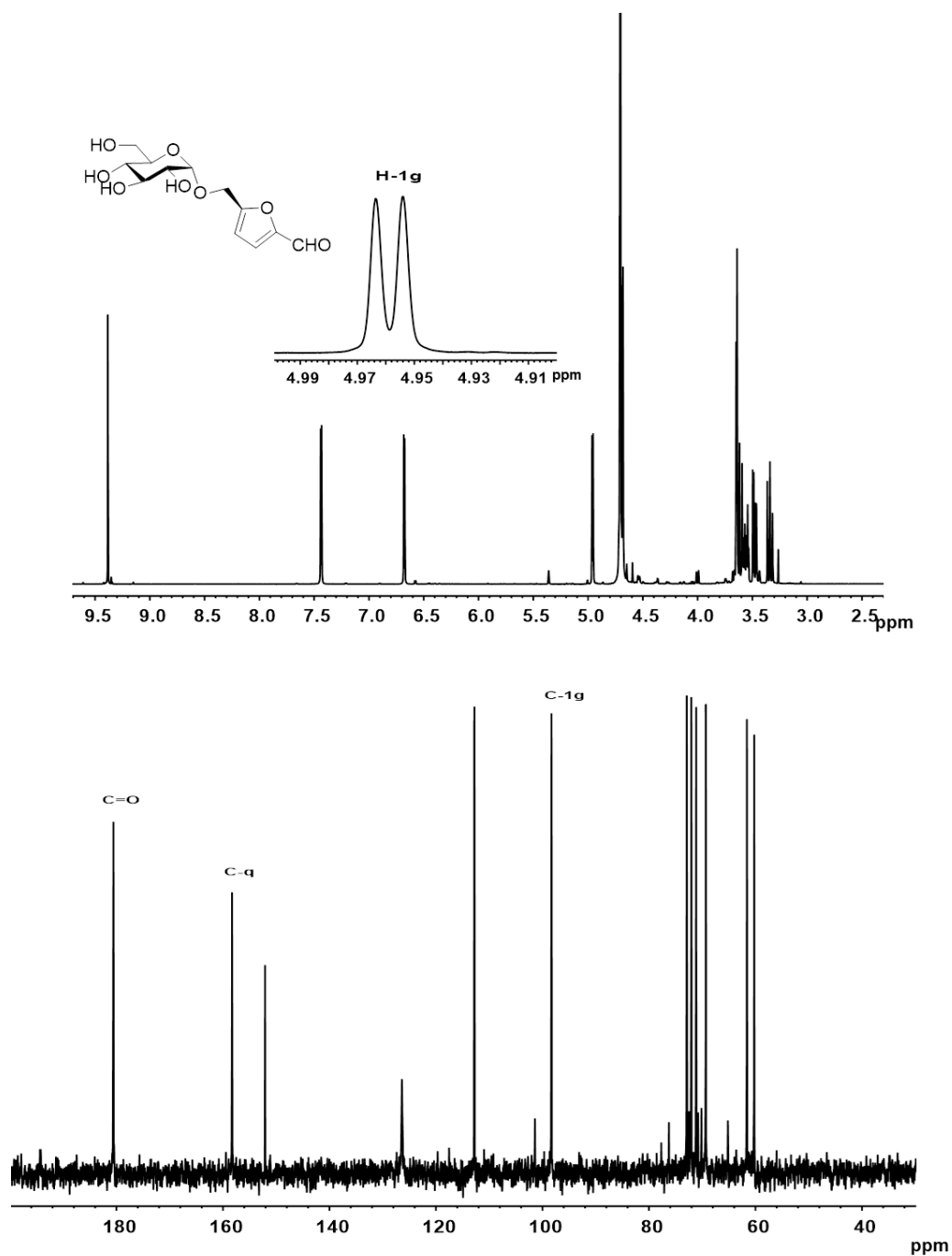


Figura 3.11. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 y 125.7 MHz, D_2O) de **23**.

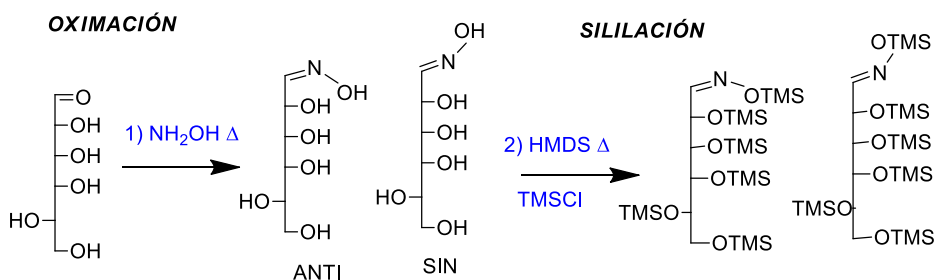
3.4. Desarrollo de un método analítico para la identificación y cuantificación de dianhidridos de Palatinosa®.

3.4.1. Separación de azúcares mediante cromatografía de gases.

La técnica que se utilizará en esta Tesis para identificar y cuantificar los compuestos presentes en el caramelo obtenido a partir de Palatinosa® es la cromatografía de gases (CG-FID; Figura 3.12.). Dado que, los azúcares no son suficientemente volátiles para ser analizados directamente por CG, las muestras se derivatizan previamente mediante oximación-trimetilsililación (ver parte experimental). Los azúcares reductores conducen así a dos picos, correspondientes a las formas *sin* y *anti* de las oximas per-sililadas, mientras que los derivados no reductores, como los DAFs originan un único pico para el correspondiente derivado per-TMS (Esquema 3.7).^{22,23}



Figura 3.12. Equipo empleado para el análisis de caramelos mediante GC-FID.



Esquema 3.7. Reacciones de derivatización de la D-fructosa mediante oximación-sililación.

3.4.2. Parámetros cromatográficos.

Para el análisis de los glicosil-DAFs se ha modificado el método descrito por Ratsimba y colaboradores,²⁴ que en esta Tesis se ha extendido para detectar pseudotetrasacaridos. El protocolo analítico utiliza una columna capilar de 100% dimetilpolisiloxano modelo CP-SIL 5 CB (7.5 m × 250 µm × 0.25 µm). Las condiciones del análisis son: temperatura del inyector, 280 °C; temperatura del detector: 365 °C; volumen de inyección 1 µL; temperatura del horno programada de 130 a 165 °C, con una rampa de 10 °C·min⁻¹, se mantiene 2 min, se aplica otra rampa de 10 °C·min⁻¹ hasta 250 °C, otra rampa de 1 °C·min⁻¹ hasta 257 °C, otra rampa de 20 °C·min⁻¹ hasta 270 °C, otra rampa de 3 °C·min⁻¹ hasta 325 °C y finalmente esta temperatura se mantiene durante 20 min. Tiempo total de adquisición 59 min (Figura 3.13.)

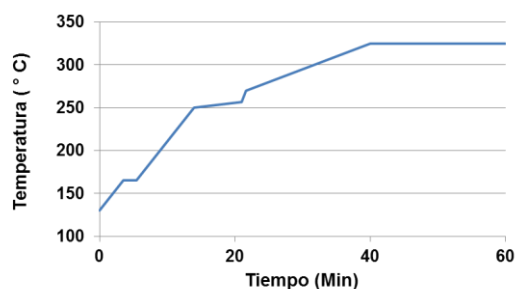


Figura 3.13. Rampa de temperatura empleada en el análisis por GC-FID de los glicosil-DAFs.

3.4.3. Determinación de los tiempos de retención y factores de respuesta para patrones puros de Palatinosa®

El análisis por cromatografía de gases de las muestras obtenidas por tratamiento de la Palatinosa® con HF-piridina (ver apartado 3.2.), tras mostró la presencia mayoritaria de los glicosil-DAFs **1**, **4** y **5**, de acuerdo con lo observado por ¹³C RMN (Figura 3.14.).

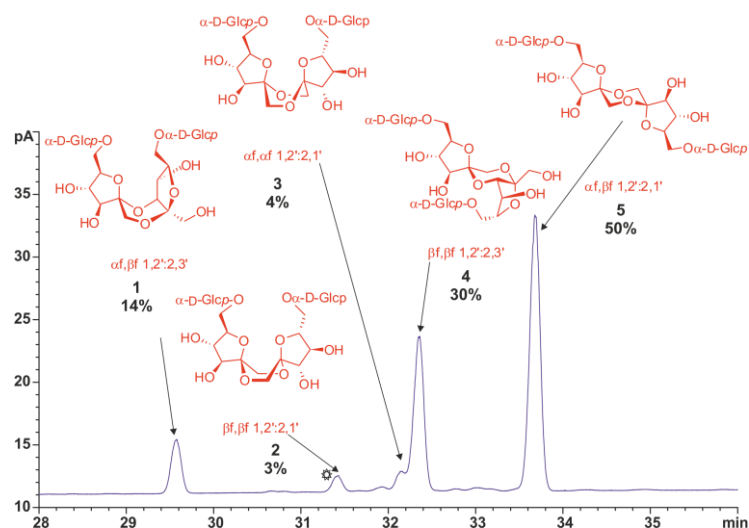


Figura 3.14. Cromatograma GC-FID del producto obtenido por tratamiento de Palatinosa[®] con HF-piridina (7:3) a 20 °C durante 60 min.

Con objeto de cuantificar los diferentes glicosil-DAFs en el caramelo de Palatinosa[®] y seguir su evolución en el tiempo, se han determinado los correspondientes factores de respuesta (K_r) utilizando los patrones puros previamente obtenidos. La linealidad de la respuesta para cada uno de los patrones se evaluó mediante una recta de regresión que relaciona las concentraciones de los compuestos y el área de los picos cromatográficos, empleando en todos los casos fenil β -D-glucopiranosido como patrón interno. Se muestran, a modo de ejemplo, las rectas de regresión y los cromatogramas obtenidos en el caso de la Palatinosa[®] y el compuesto **5** (Figura 3.15.). Los valores de los tiempos de retención y los factores de respuesta obtenidos de esta manera por los patrones están recogidos en la Tabla 3.2. Los valores de K_r se calculan a partir de la expresión:

$$Kr = \frac{A_x/m_x}{A_{SI}/m_{SI}} = \frac{A_x}{A_{SI}} \times \frac{m_{SI}}{m_x}$$

m_{SI} : cantidad de estándar interno (fenil β -D-glucopiranosido) (mg)

m_x : cantidad de compuesto x (glucosa, disacáridos, etc) (mg)

A_x : área del pico correspondiente al compuesto x .

A_{SI} : área del pico correspondiente al estándar interno.

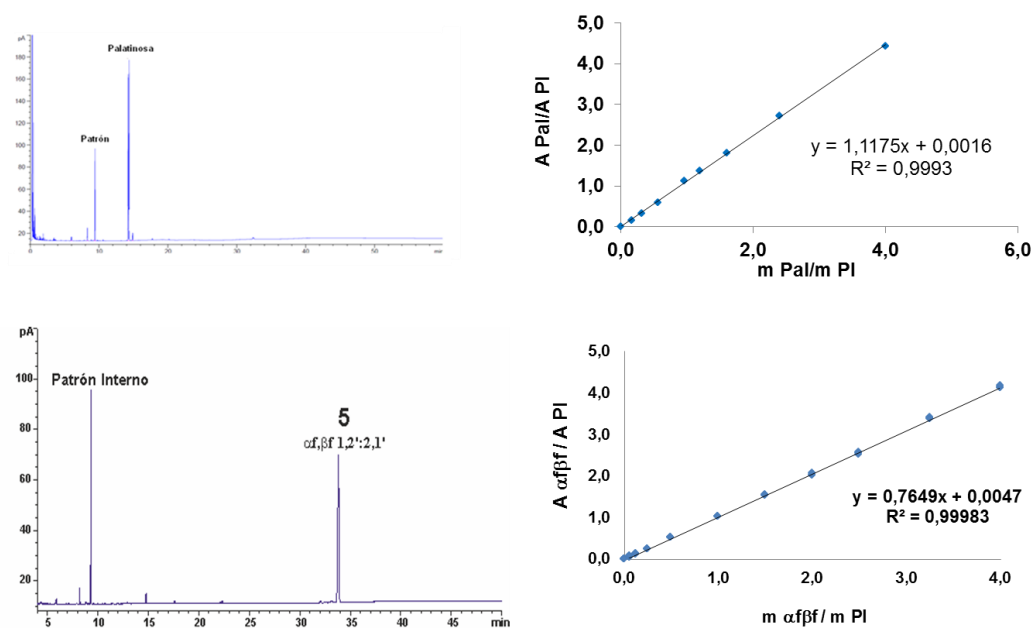


Figura 3.15. Cromatogramas GC-FID y rectas de calibrado correspondientes al análisis de la Palatinosa® (a) y del compuesto **5** (b).

Tabla 3.2. Factores de respuesta (K_r) para la D-fructosa, D-glucosa, Palatinosa[®], G-HMF y los dianhidridos de Palatinosa[®] **3** y **5**.

Azúcar	Tiempo de retención (min)		Factor de respuesta (K_r)
Fructosa	5.358	5.476	1.549
Glucosa	6.173	6.355	1.543
G-HMF	11.941	11.998	0.749
Palatinosa[®]	14.102	14.229	1.117
3	31.985	33.363	0.708
5	33.489	33.652	0.761

3.5. Caramelización de la Palatinosa[®] empleando catalizadores heterogéneos y activación mediante irradiación por microondas

En trabajos previos a esta Tesis se han realizado estudios para promover la caramelización de disoluciones concentradas de D-fructosa utilizando resinas ácidas de intercambio iónico,²⁵ observándose un aumento significativo en la proporción de DAFs. Se prepararon así caramelos enriquecidos en oligosacáridos con actividad prebiótica.²⁶ Teniendo en cuenta la estructura disacáridica de la Palatinosa[®], con una unidad reductora de fructosa, cabe esperar que se produjesen igualmente reacciones de dimerización para originar dianhidridos de Palatinosa[®] (glicosil-DAFs) por lo que nos hemos centrado, en primer lugar, en el uso de la resina Lewatit[®] S2328 (H^+), zeolitas y sílicas ácidas ($H_2SO_4 \cdot SiO_2$ y $H_3PO_4 \cdot SiO_2$) como catalizadores para estudiar la caramelización de Palatinosa[®] en condiciones heterogéneas.

Las reacciones se llevaron a cabo en un reactor equipado con un agitador mecánico (IKA LR2 ST versión 3) y un termopar (Figura 3.16.) y el procedimiento general fue el siguiente: se disolvió la Palatinosa[®] en agua, se añadió el catalizador y se calentó la mezcla de reacción utilizando un baño de silicona (la temperatura, la proporción de

catalizador y el tiempo de reacción de cada experimento se indican en la la parte experimental). Se extrajeron alícuotas a determinados intervalos de tiempo, se separó el catalizador y las muestras se liofilizaron previamente a su análisis por GC (Figura 3.17).



Figura 3.16. Reactor utilizado para la caramelización de Palatinosa[®] en condiciones heterogéneas.



Figura 3.17. Muestras de la cinética del caramelo de Palatinosa[®].

3.5.1. Caramelización de la Palatinosa[®] empleando resina Lewatit S2328(H^+)

Las resinas sintéticas de intercambio iónico consisten en una matriz polimérica reticulada por la acción de un agente entrecruzante y derivatizada con diferentes grupos

funcionales (Figura 3.18). La mayoría de las resinas comerciales están basadas en la estructura estireno-divinilbenceno, debido a su buena resistencia química y física y a su estabilidad en un amplio rango de pH y de temperatura. Son, de hecho, los materiales más habituales en las aplicaciones de intercambio iónico en la industria.

En nuestro caso, los estudios de caramelización se han efectuado usando la resina ácida manufacturada por Bayer de nombre comercial Lewatit® S2328. La Lewatit® S2328 es una resina fuertemente ácida (grupos SO_3H), con bajo entrecruzamiento y de tipo macroporoso. Se caracteriza por disponer de una gran superficie interna que permite el acceso de moléculas grandes a los centros activos de las partículas de resina. Se utiliza en la industria azucarera para la hidrólisis de la sacarosa (“inversión”), por ejemplo durante la producción de fructosa, y para decolorar disoluciones de azúcar que contienen cationes orgánicos de elevado peso molecular. Sus características se resumen a continuación:

- Diámetro de partícula (esférica): 0.4-1.25 mm (16-40 US mesh).
- Densidad: 1.1 g/mL.
- Retención de agua: 65-70% en peso.
- Rango de temperatura de estabilidad: -10 a 120 °C.
- Rango de pH de estabilidad: 0 a 14.
- Almacenamiento: 2 años a temperaturas entre -20 y 40 °C.

Tras acondicionarla por tratamiento con disolución de ácido clorhídrico, mediante el procedimiento que se describe en la parte experimental, y valorarla se determinó su capacidad de intercambio iónico: 4.34 mequiv H^+ /g de resina seca.

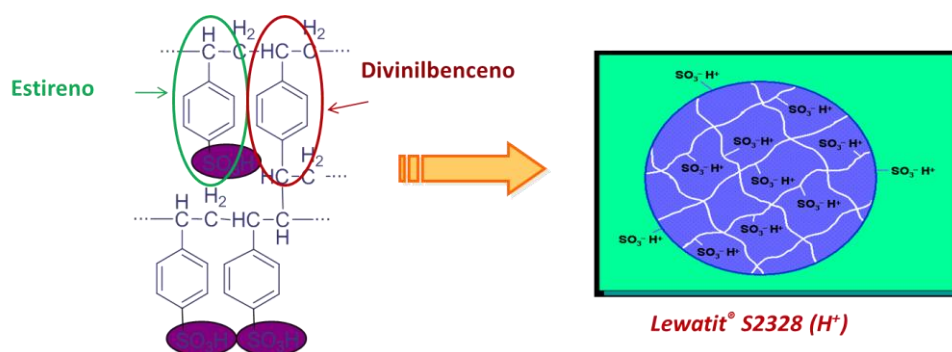


Figura 3.18. Estructura de la resina ácida de intercambio iónico Lewatit S2328 (H⁺).

Para el estudio de la cinética de caramelización de la Palatinosa[®] se utilizaron disoluciones al 80% y 90% (p/v) en agua desionizada, proporciones del 10% y 20% del catalizador en peso relativo al azúcar y temperaturas de reacción de 80 °C y 90 °C. En la Parte Experimental se recogen los datos de condiciones de reacción empleados en cada caso. En todos los estudios se tomaron alícuotas de reacción a diferentes intervalos de tiempo para su análisis.

A la vista de los resultados obtenidos en el análisis de mezclas de dianhidridos de Palatinosa[®] obtenidos por tratamiento de Palatinosa[®] con HF-Py utilizando la GC, nos planteamos en primer lugar aplicar esta metodología al análisis de los caramelos de Palatinosa[®] obtenidos utilizando catalizadores heterogéneos. En la Figura 3.19 se muestra el perfil cromatográfico de un caramelo de Palatinosa[®] obtenido por calentamiento en presencia de resina Lewatit S2328[®] al 20% a 90 °C durante 60 min. En el se identifican los picos correspondientes a los monosacáridos glucosa, fructosa (entre 5-7 min), el G-HMF (entre 11-12 min), la Palatinosa residual entre (14-15 min) y la zona de los mono y diglicosil-DAFs (entre 21-24 min y entre 28-35 min, respectivamente). Por encima de 35 min se observan picos que se atribuyen a la presencia de oligosacáridos lineales que no han sufrido la reacción de glicosidación intramolecular que origina los DAFs.

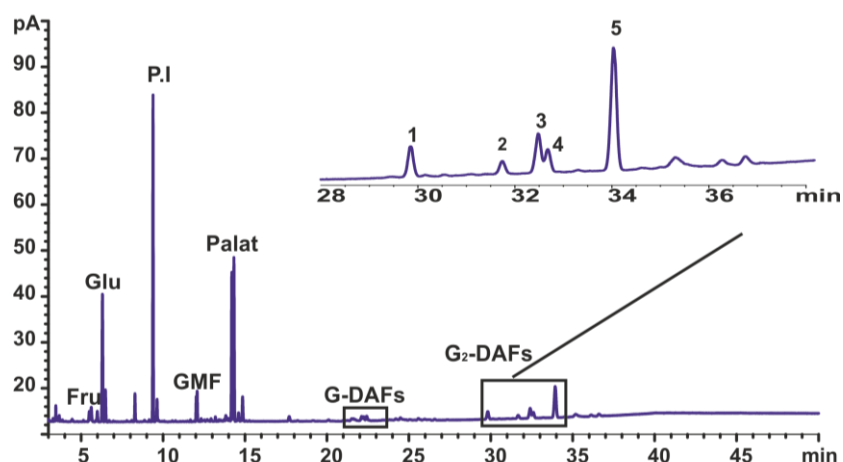


Figura 3.19. Cromatograma GC-FID del caramelo de Palatinosa® (80%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit S2328 (H⁺) (20%) durante 60 min.

En la zona de los dianhidridos de Palatinosa® el dianhidrido **5** (α,β f 1,2':2,1') es el compuesto mayoritario de modo análogo a los resultados obtenidos por tratamiento de la Palatinosa® con HF-Py.

La concentración inicial de Palatinosa® y la temperatura de reacción tienen un efecto muy notable en la velocidad de conversión y en la isomerización de los compuestos de control cinético a los de control termodinámico. Así, al comparar los caramelos obtenidos a partir de disoluciones de Palatinosa® al 80% y 90% se observa que el aumento en la concentración de azúcar favorece la formación de oligosacáridos lineales a tiempos de reacción cortos, que se transforman en glicosil-DAFs conforme avanza la reacción (Figura 3.20.).

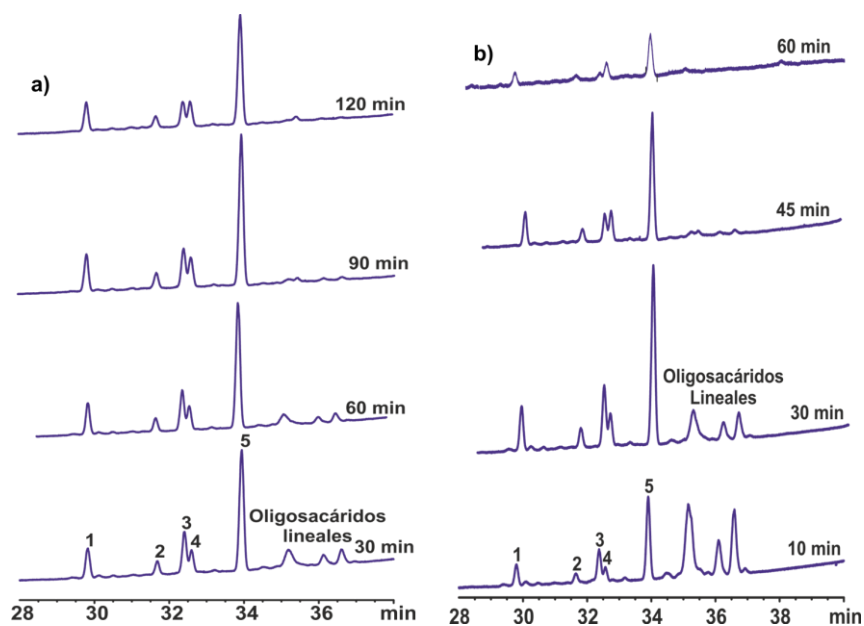


Figura 3.20. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa® al 80% (a) y 90% (b) a 90 °C, en presencia resina Lewatit S2328 (H⁺) (20%). Región de los dianhidridos de Palatinosa® a 30, 60, 90 y 120 min (a) y 10, 30, 45 y 60 min (b).

La velocidad de conversión de la Palatinosa® en dianhidridos de Palatinosa® y derivados oligosacáridicos es más rápida cuando se utiliza una concentración inicial de azúcar al 90%. La reacción de reversión para formar oligosacáridos superiores está también favorecida a concentraciones elevadas, lo que se traduce en una disminución de la proporción de los glicosil-DAFs a tiempos de reacción largos (Figura 3.21.). La concentración máxima de dianhidridos de Palatinosa® en la caramelización al 80%, con un 20% de catalizador a 90 °C, se alcanza a los 30 min y supone aproximadamente el 30%. Al aumentar la concentración inicial de Palatinosa® al 90%, la transformación de los correspondientes dianhidridos en oligosacáridos superiores es muy rápida y prácticamente los glicosil-DAFs desaparecen a los 60 min. La proporción de glucosa, fructosa y G-HMF es mínima en estas condiciones (por debajo del 10% para la glucosa y del 5% para fructosa y G-HMF).

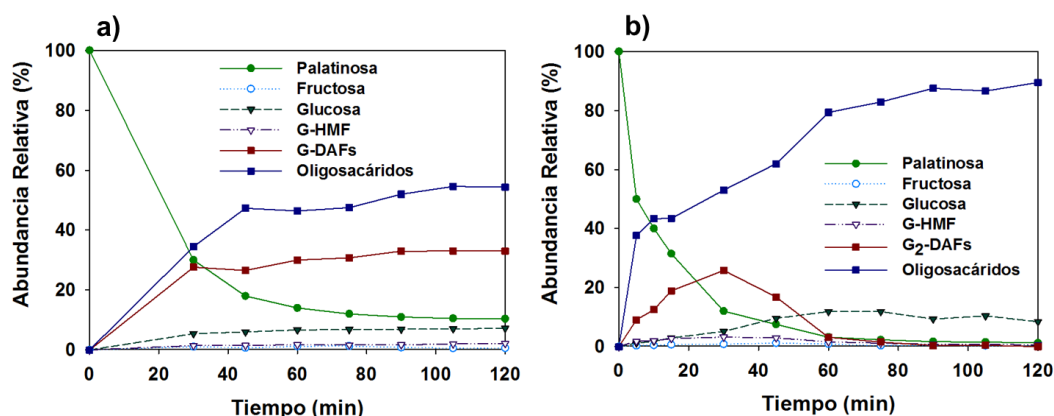


Figura 3.21. Variaciones de las proporciones de Palatinosa®, D-fructosa, D-glucosa, G-HMF, dianhidridos de Palatinosa® y oligosacáridos superiores durante la caramelización de Palatinosa® al 80%, (a) y 90% (b) a 90°C con resina Lewatit S2328 (H⁺) (20%).

En el espectro de EM-ESI se identificaron los picos pseudomoleculares $[M + Na]^+$ correspondientes a los monosacáridos (m/z 203), glucosil-HMF (G-HMF, m/z 311), di- (m/z 365) y trisacáridos (m/z 527), así como a los mono- (m/z 509), di- (m/z 671), tri- (m/z 833) y tetraglicosil-DAFs (m/z 995; Figura 3.22.).

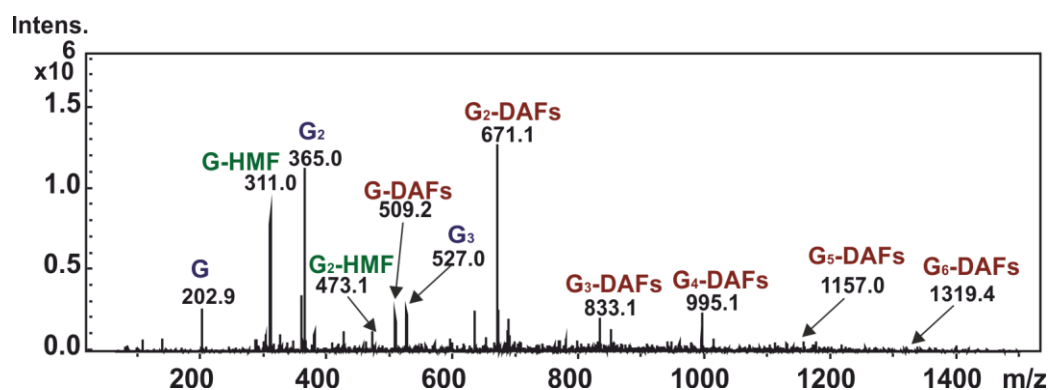


Figura 3.22. Espectro de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa® (80%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit® S2328 (H⁺) (20%) durante 60 min.

En la región de los dianhidridos de Palatinosa[®] (G₂-DAFs), el compuesto **5** ($\alpha f, \beta f$ 1,2':2,1') es el que se observa en mayor proporción, seguido de los compuestos **3** ($\alpha f, \alpha f$ 1,2':2,1') y **1** ($\alpha f, \beta f$ 1,2':2,3') (Figura 3.23.).

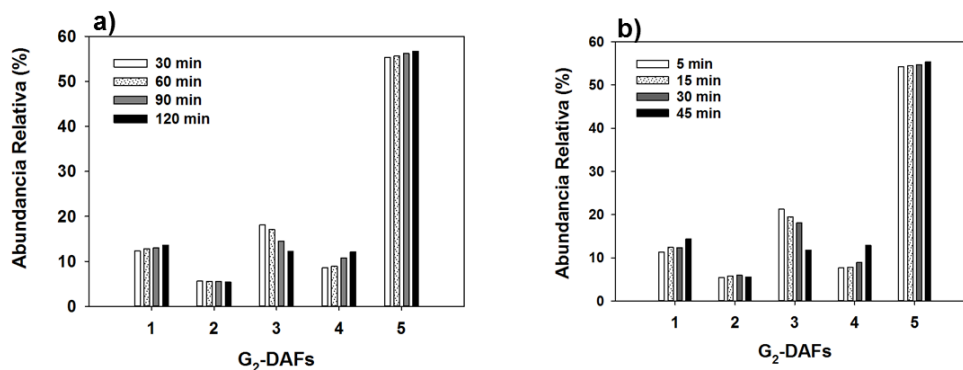


Figura 3.23. Variaciones de las proporciones de dianhidridos de Palatinosa[®] durante la caramelización de Palatinosa[®] al 80%, (a) y al 90% (b) a 90 °C con Lewatit S2328 (H⁺) (20%).

Al disminuir la proporción de catalizador del 20% al 10% la velocidad de formación de dianhidridos de Palatinosa[®] disminuye. Los oligosacáridos lineales se forman al comienzo del proceso pero van disminuyendo con el tiempo. Así, en los cromatogramas de gases a tiempos cortos se observan picos a tiempos de retención mayores que se asignan a oligosacáridos lineales. La intensidad de estos picos disminuye con el tiempo, debido a su transformación en dianhidridos cíclicos (Figura 3.24).

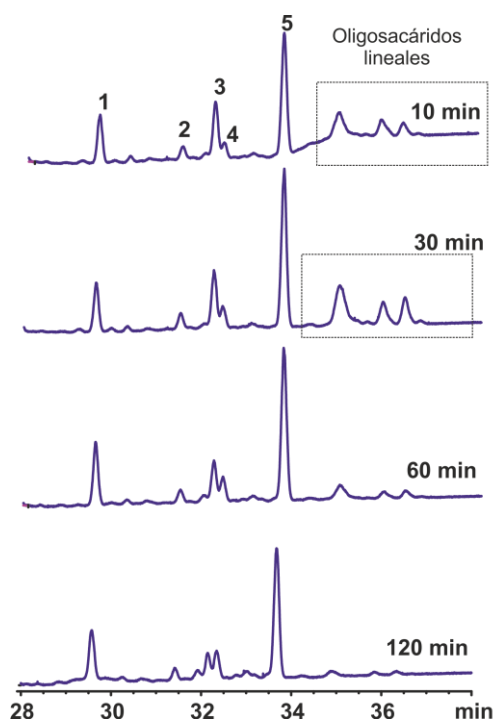


Figura 3.24. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit[®] S2328 (H⁺) (10%). Región de dianhidridos de Palatinosa[®] a 10, 30, 60 y 120 min.

A partir de una disolución de Palatinosa[®] al 90% utilizando una proporción del 10% de resina a 90 °C, se alcanza una proporción de dianhidridos de Palatinosa[®] del 35% tras 30 min de reacción (Figura 3.25.). El espectro de EM-ESI, es similar al comentado en el caso del 20% de catalizador (Figura 3.26.).

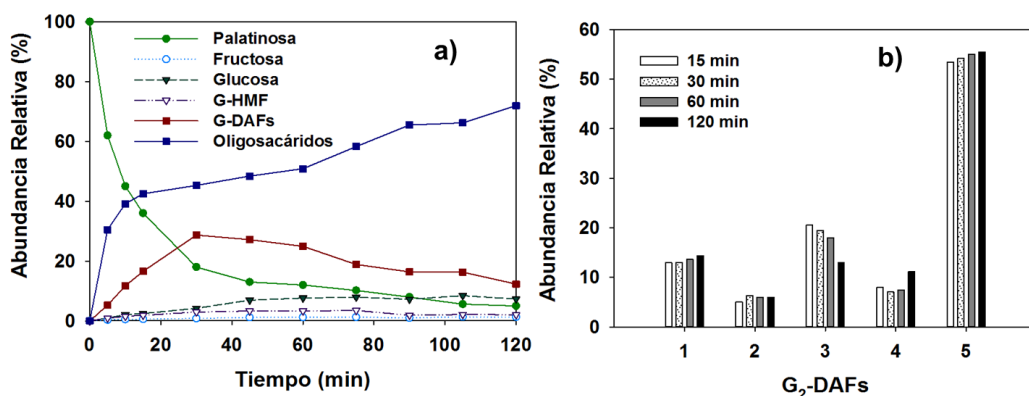


Figura 3.25. Cinética de caramelización de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit[®] S2328 (H⁺) (10%) durante 120 min (a). Variación de las proporciones relativas de G₂-DAFs (b).

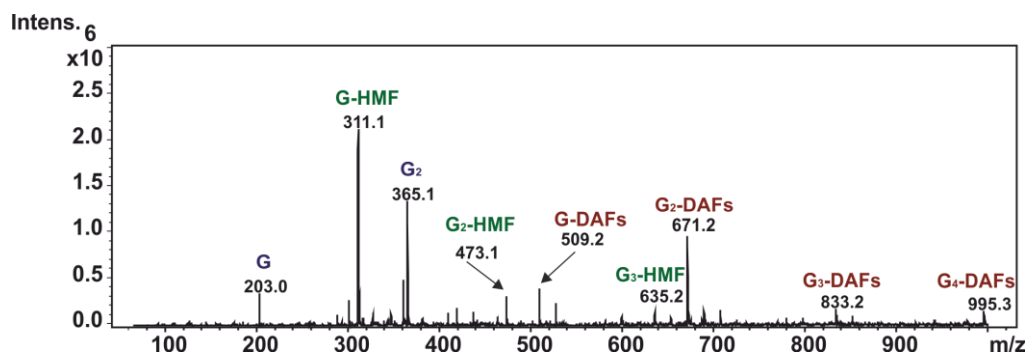


Figura 3.26. Espectro de masas ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit[®] S2328 (H⁺) (10%) durante 60 min.

En resumen, los resultados obtenidos con la resina Lewatit S2328[®] son prometedores en lo que se refiere a su utilización en la producción de compuestos enriquecidos en dianhidridos de Palatinosa[®].

3.5.2. Caramelización de la Palatinosa® usando zeolita como catalizador

El uso de zeolitas ácidas como catalizadores en síntesis orgánica ha adquirido una gran importancia en los últimos tiempos. Las zeolitas son aluminosilicatos porosos y cristalinos neutras o cargadas negativamente según el procedimiento con el que hayan sido sintetizadas. Las más comunes son las que presentan un ión Na^+ como contraión e incorporan agua dentro de los poros. Mediante procesos de intercambio iónico pueden incorporarse diferentes cationes.

La utilización de zeolitas, en su forma ácida, como catalizadores heterogéneos en la formación de dianhidridos de fructosa presenta un gran interés. La amplia variedad de zeolitas disponibles comercialmente permite escoger catalizadores con diferente acidez, que deben permitir controlar la cinética de la formación de los DAFs y glicosil- DAFs. Para su utilización como catalizador ácido, las zeolitas utilizadas en este estudio se acondicionaron previamente en la forma H^+ . Para ello, se sometieron a un tratamiento con disolución de cloruro de amonio para desplazar el catión metálico de la muestra comercial (generalmente Na) por el catión amonio NH_4^+ . El calentamiento de la forma amónica provoca el desprendimiento de amoníaco, obteniéndose la zeolita en forma ácida.

En este apartado se presentan los resultados de la caramelización de la Palatinosa® utilizando tres zeolitas diferentes .. Su denominación comercial y módulo (proporción Si/Al; entre paréntesis) son FAU (56), FAU25 (25) y FAU56 (15). Las zeolitas que incluyen las siglas FAU en su denominación pertenecen a la familia de Faujasita, caracterizada por una estructura en capas hexagonales (Figura 3.27.).

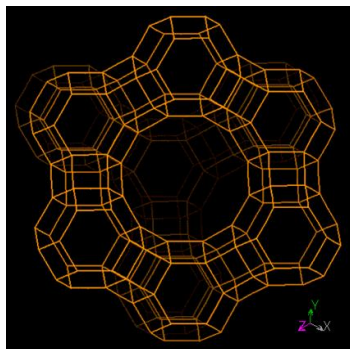


Figura 3.27. Estructura típica de la zeolita tipo faujasita (FAU).

Para determinar la influencia de la proporción de catalizador, se realizaron experimentos con una disolución de Palatinosa[®] al 90% utilizando 10% y 20% de zeolita FAU (56) a 90 °C. En los dos casos se obtuvieron conversiones bajas de dianhidridos de Palatinosa[®], incluso a tiempos de reacción prolongados (48 h) (Figuras 3.28 y 3.29). Cabe destacar que el uso de zeolita conduce a mayor proporción del dianhidrido de Palatinosa[®] **3** que en el caso de la resina Lewatit S2328. Por ejemplo, con un 20% de FAU56 el compuesto **3** pasa a ser el dianhidrido mayoritario en cproporción superior al compuesto **5**. Tras 6 h de tratamiento se alcanza un 30% de dianhidridos de Palatinosa[®], sin observar la formación de oligosacáridos lineales, siendo la proporción de isómeros de dianhidridos de Palatinosa[®] diferente de la obtenida con la resina (Figura 3.30.).

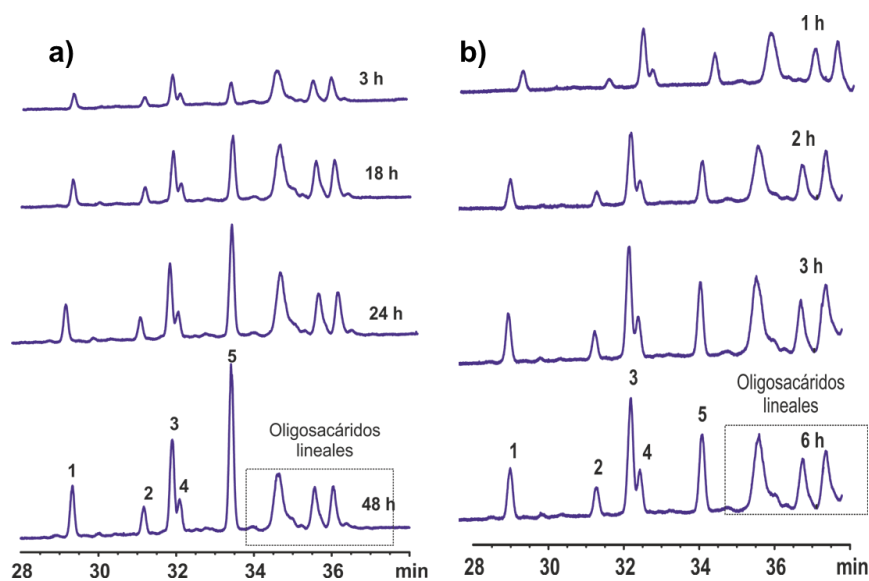


Figura 3.28. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de zeolita FAU 56 (10%) (a) y (20%) (b). Región de los dianhidridos de Palatinosa[®] a 3, 18, 24, 48 h (a) y 1, 2, 3, 6 h (b).

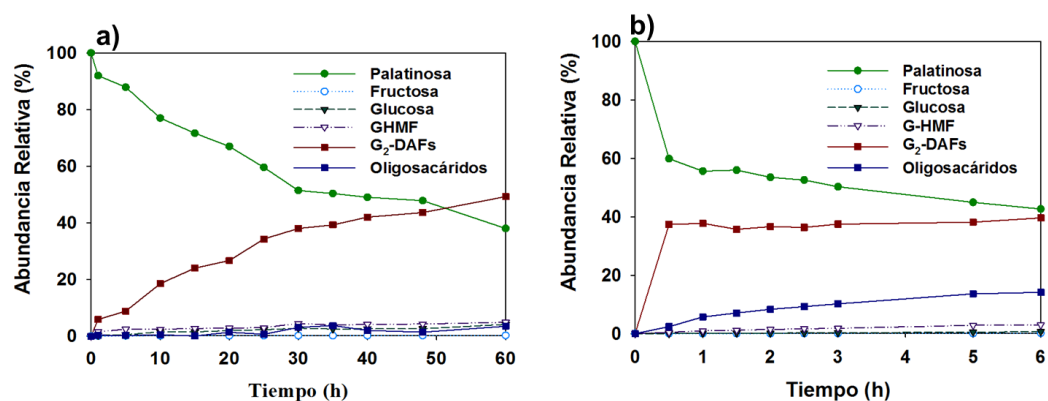


Figura 3.29. Variaciones de las proporciones de Palatinosa[®], D-fructosa, D-glucosa, G-HMF, dianhidridos de Palatinosa[®] y oligosacáridos superiores durante la caramelización de Palatinosa (90%) a 90 °C con zeolita FAU 56 (10%) durante 60 h (a) y (20%) durante 6 h (b).

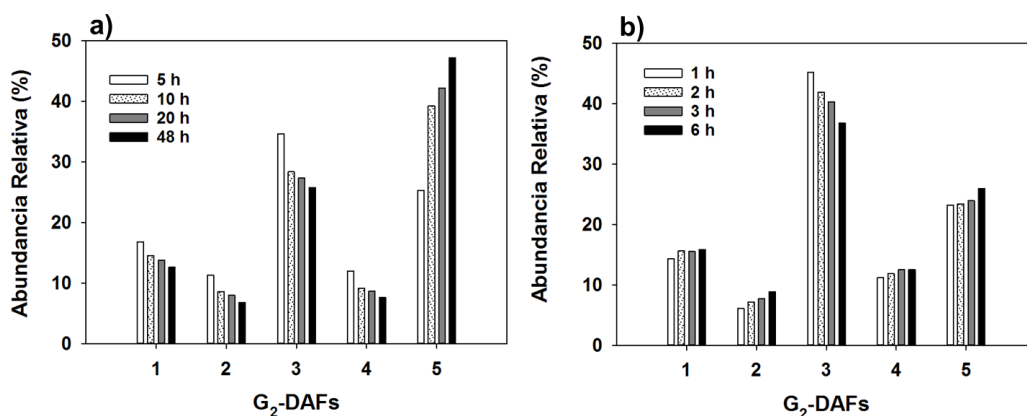


Figura 3.30. Variaciones de las proporciones de dianhidridos de Palatinosa® durante la caramelización de Palatinosa® (90%) a 90 °C con zeolita FAU 56 (10%) (a) y (20%) (b).

En las experiencias realizadas con la zeolita FAU (25) al 10% y 20%, los resultados observados fueron similares a los obtenidos con FAU (56), con conversiones relativamente bajas en dianhidridos de Palatinosa® (Figuras 3.31 y 3.32).

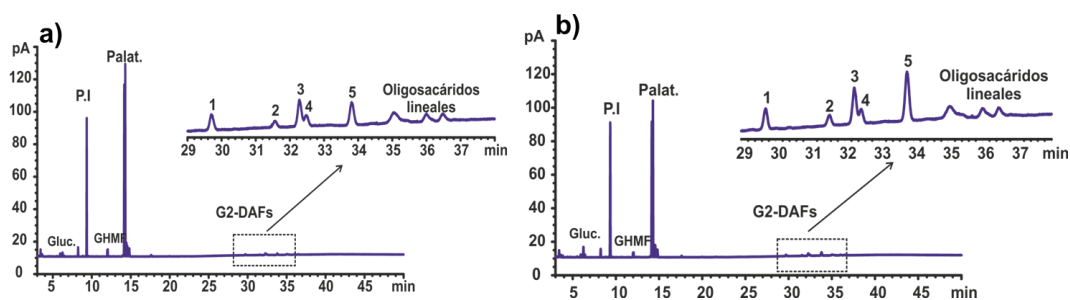


Figura 3.31. Cromatogramas GC-FID del caramelo de Palatinosa® (90%) a 90 °C durante 8 h en presencia de zeolita FAU 25 (10%) (a) y (20%) (b).

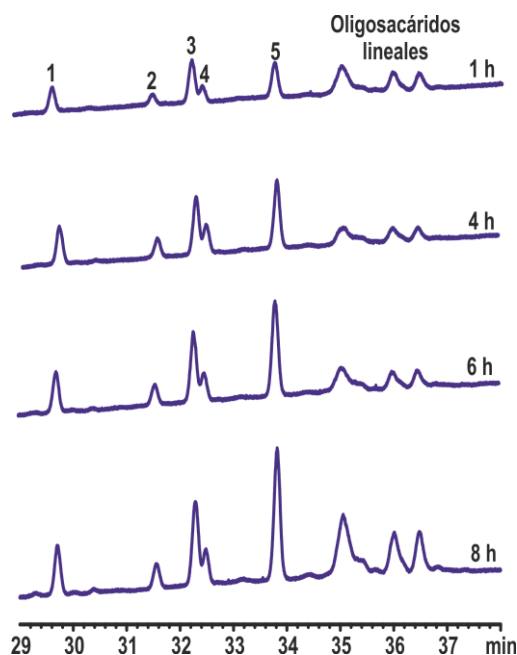


Figura 3.32. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de zeolita FAU 25 (20%). Región de los dianhidridos de Palatinosa[®] a 1, 4, 6 y 8 h.

En presencia de un 20% de FAU 25 como catalizador se alcanzó un 21% de dianhidridos de Palatinosa[®] al cabo de 8 h a 90 °C, sin que llegue a observarse la formación de oligosacáridos lineales (Figura 3.34). En el espectro de EM-ESI se identificaron los picos pseudomoleculares $[M + Na]^+$ correspondientes al glucosil-HMF (G-HMF, 311), disacáridos (G_2 , 365) y diglicosil-DFAs (G_2 -DAFs, 671) (Figura 3.33).

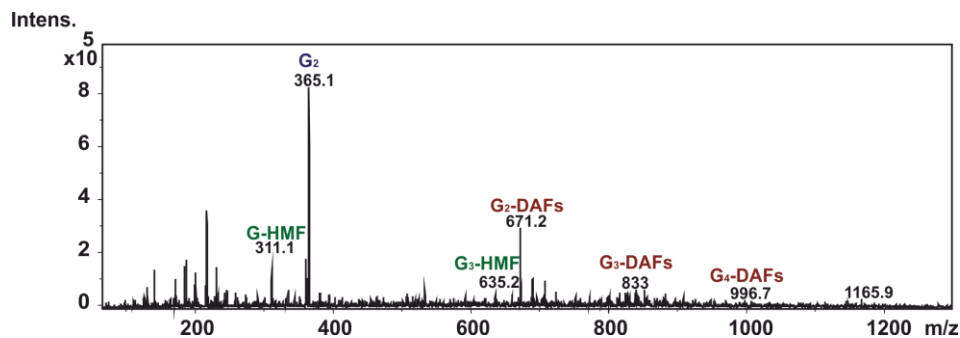


Figura 3.33. Espectro de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa® (90%) a 90 °C en presencia de zeolita FAU 25 (20%) durante 8 h.

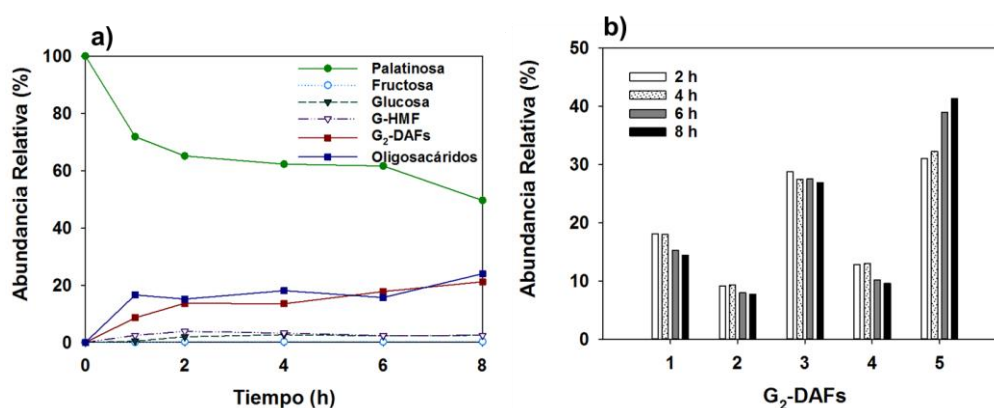


Figura 3.34. Cinética de caramelización de Palatinosa® (90%) a 90 °C en presencia de zeolita FAU 25 (20%) durante 8 h (a). Variación de las proporciones relativas de G₂-DAFs (b).

Por último, se han llevado a cabo ensayos de caramelización partiendo de Palatinosa® al 90% y proporciones del 10% y 20% de zeolita FAU (15) a 90 °C. Las conversiones en dianhidridos de Palatinosa® fueron algo mayores que con las zeolitas FAU (56) y FAU (25). Así, en el caso de la reacción usando 20% de catalizador, la proporción de dianhidridos de Palatinosa® alcanzó el 30% tras 6 h siendo el compuesto **3** el producto mayoritario. (Figuras 3.35 y 3.36).

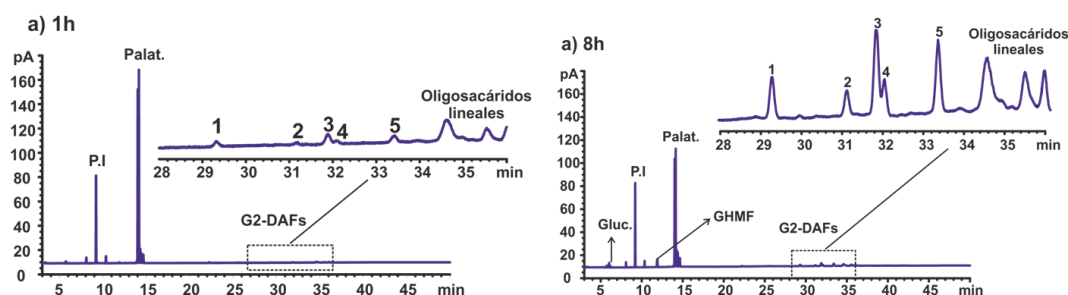


Figura 3.35. Cromatogramas GC-FID del caramelo obtenido a partir de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C durante 8 h en presencia de zeolita FAU 15 (10%) (a) y (20%) (b).

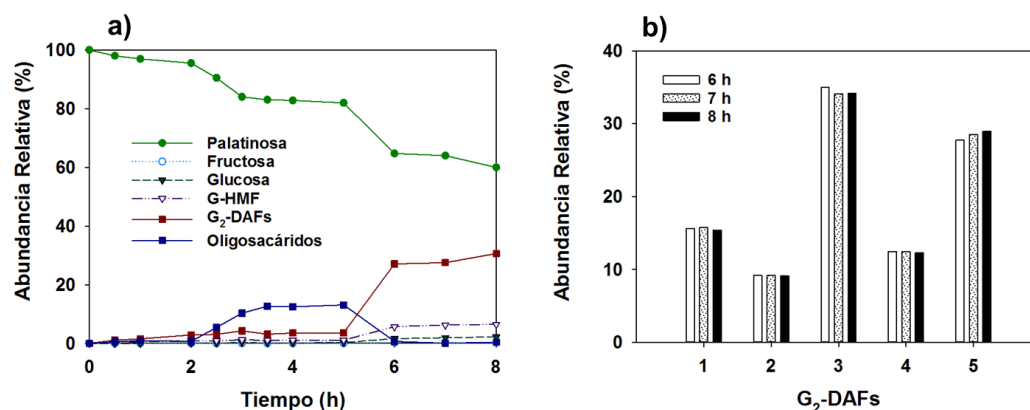


Figura 3.36. Cinética de caramelización de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de zeolita FAU 15 (20%) durante 8 h (a). Variación de las proporciones relativas de G₂-DAFs (b).

En conclusión, empleando zeolitas FAU en forma ácida la reacción de caramelización de la Palatinosa[®] avanza más lentamente que con la resina Lewatit[®] S2328 (H⁺) pero puede controlarse la naturaleza de los productos formados. Además, la proporción de isómeros de dianhidridos de Palatinosa[®] es diferente: mientras que con la resina el dianhidrido **5** ($\alpha\text{f},\beta\text{f}$ 1,2':2,1') es el producto mayoritario; en el caso de la zeolita FAU (15) el dianhidrido **3** ($\alpha\text{f},\alpha\text{f}$ 1,2':2,1') es el que se obtiene en mayor proporción.

3.5.3. Caramelización de la Palatinosa[®] con sílica $H_2SO_4 \cdot SiO_2$ (SAS)

En este apartado presentamos los resultados de la caramelización de la Palatinosa[®] promovida por ácido sulfúrico soportado sobre sílica, $H_2SO_4 \cdot SiO_2$ (SAS). La preparación de la SAS se realizó siguiendo el método descrito en la bibliografía²⁷ (ver Parte Experimental). Para el estudio cinético preliminar de caramelización de la Palatinosa[®] se utilizó una disolución de Palatinosa[®] al 80% y un 10% de SAS como catalizador a 80 °C, y se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo para su análisis por cromatografía de gases.

En los perfiles cromatográficos (GC-FID) de las muestras de caramelo se identificaron picos correspondientes a los glicosil-DAFs, con tiempos de retención comprendidos entre 28 y 35 min. La intensidad de los picos muestra que el compuesto **5** es mayoritario, como cabría esperar en condiciones de control termodinámico, seguido del compuesto **3**. Se observa además la formación de oligosacáridos lineales al inicio de la reacción, que van desapareciendo con el tiempo (Figura 3.37.). En las condiciones de este ensayo se alcanza una proporción máxima de dianhidridos[®] de 30%. El perfil cromatográfico es similar al obtenido con la resina Lewatit[®] S2328 (H^+), siendo el compuesto **5** el isómero mayoritario. El derivado simétrico **3** es más sensible al progreso de la reacción pasando su proporción relativa dentro de la fracción de los dianhidridos de Palatinosa[®] (G_2 -DAFs), de un 25% a los 15 min a un 8% al cabo de 120 min (Figura 3.38).

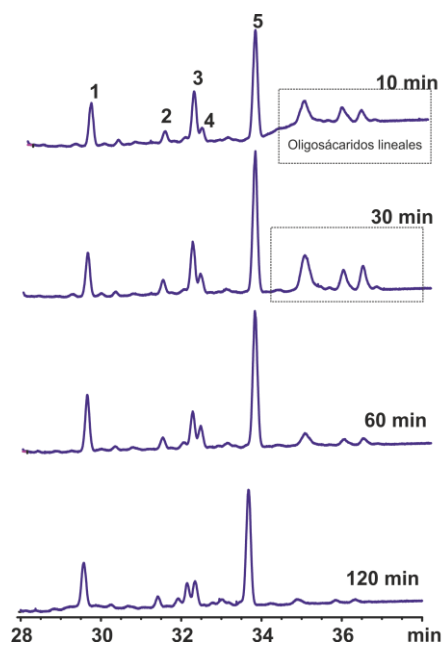


Figura 3.37. Cromatogramas GC -FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%). Región de los dianhidridos de Palatinosa[®] a 10, 30, 60 y 120 min.

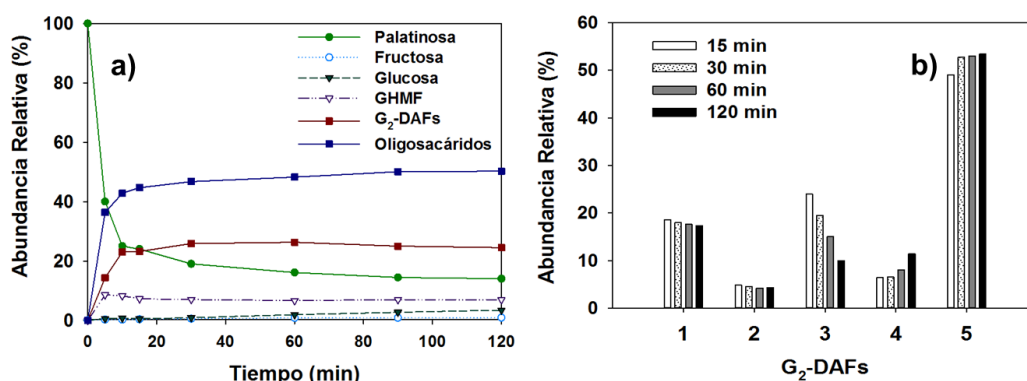


Figura 3.38. Cinética de caramelización de Palatinosa[®] (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) durante 120 min (a). Variación de las proporciones relativas de G₂-DAFs (b).

En el espectro de EM-ESI se observan los picos pseudomoleculares para glucosil-HMF (GMF, 311), Palatinosa[®] residual (365) y monoglicosil- (509) y diglicosil-DAFs (671) (Figuras 3.39.).

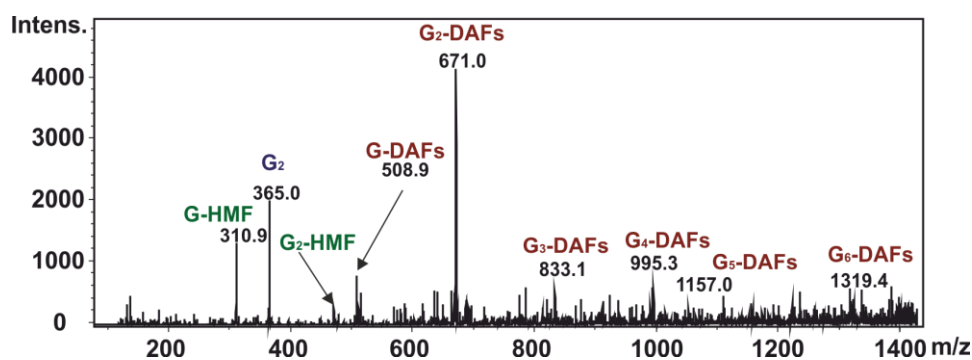


Figura 3.39. Espectro de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa[®] (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) durante 60 min.

3.5.4. Caramelización de Palatinosa[®] con sílica $H_3PO_4 \cdot SiO_4$ (SAF)

Para el estudio de la cinética de caramelización de la Palatinosa[®] promovida por la sílica ácida $H_3PO_4 \cdot SiO_2$ (SAF), se preparó el catalizador siguiendo el método descrito en la bibliografía²⁸ (ver Parte Experimental). Empleando una disolución de Palatinosa[®] al 80%, a 80 °C y un 10% de SAF como catalizador, el control mediante GC-FID de la cinética de caramelización mostró variaciones tanto en el contenido total como en las proporciones relativas de los dianhidridos de Palatinosa[®] (Figuras 3.40 y 3.41). La conversión de la Palatinosa[®] es mucho más lenta cuando se usa SAF como catalizador en vez de SAS, de acuerdo con la mayor acidez del ácido soportado (Figura 3.41). En cualquier caso, el dianhidrido **5** continúa siendo el compuesto mayoritario. La necesidad de usar tiempos de reacción más largos favorece los procesos de isomerización hacia los derivados de control termodinámico, como lo demuestra la menor proporción relativa del diastereoisomero simétrico **3**, a favor del derivado **1** (Figura 3.41)

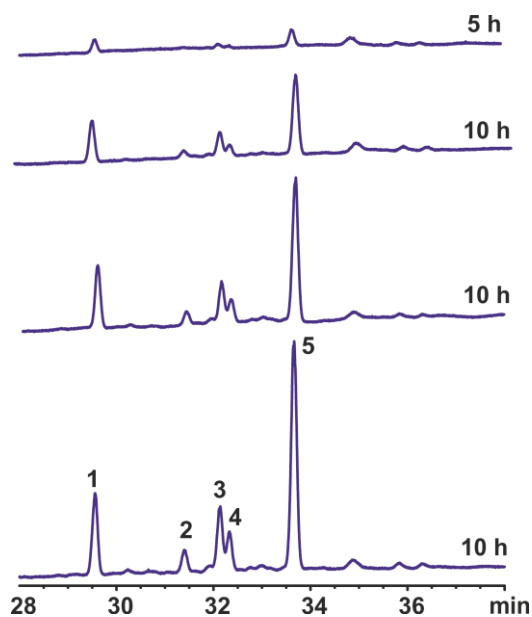


Figura 3.40. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%). Región de los dianhidridos de Palatinosa[®] a 10, 30, 60 y 120 min.

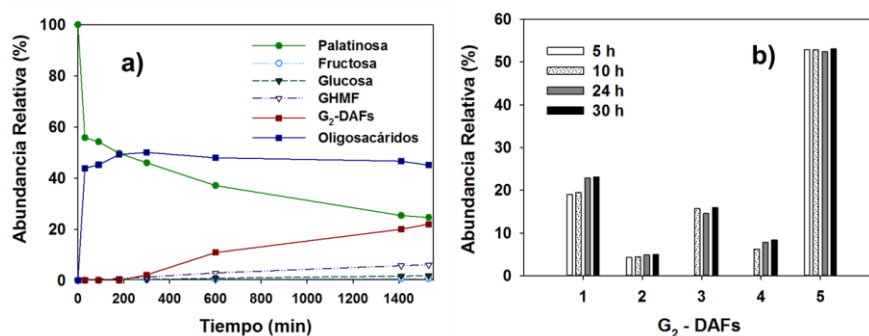


Figura 3.41. Cinética de caramelización de Palatinosa[®] (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) (a). Variación de las proporciones relativas de G₂-DAFs (b).

3.5.5. Caramelización de la Palatinosa® por activación mediante irradiación por microondas

La irradiación por microondas ha adquirido una importancia considerable en el campo de la síntesis orgánica^{29,30}. El uso de microondas, conduce frecuentemente a procesos con menor formación de subproductos, reacciones más selectivas y rápidas y, en muchos casos, no requiere utilizar disolventes orgánicos, en consonancia con los requerimientos de la química verde^{31,32}.

Sin embargo, la irradiación por microondas para la caramelización de azúcares está menos documentada. Idri y col., han descrito la preparación de caramelos enriquecidos en DFAs a partir de fructosa utilizando resina ácida como catalizador e irradiación por microondas en lugar del calentamiento convencional, lo que permite reducir considerablemente los tiempos de reacción (hasta 10 veces menos).³³

En este apartado se presentan los resultados de varios experimentos utilizando la irradiación por microondas para la obtención de caramelos de Palatinosa® promovida por resina Lewatit S2328 (H⁺) y la sílica ácida SAS. Las reacciones se llevarán a cabo en tubos de vidrio sellados (ver Parte Experimental).

En el caso de la resina se realizaron experimentos con potencias de irradiación de 100 y 200 W y 10% de catalizador. En la Figura 3.42 se muestran los perfiles cromatográficos correspondientes (GC-FID) para la región de los dianhidridos de Palatinosa® (tiempo de retención entre 28-34 min). En los que, como cabe esperar, se observa que el aumento de la potencia de irradiación acelera la reacción de caramelización.

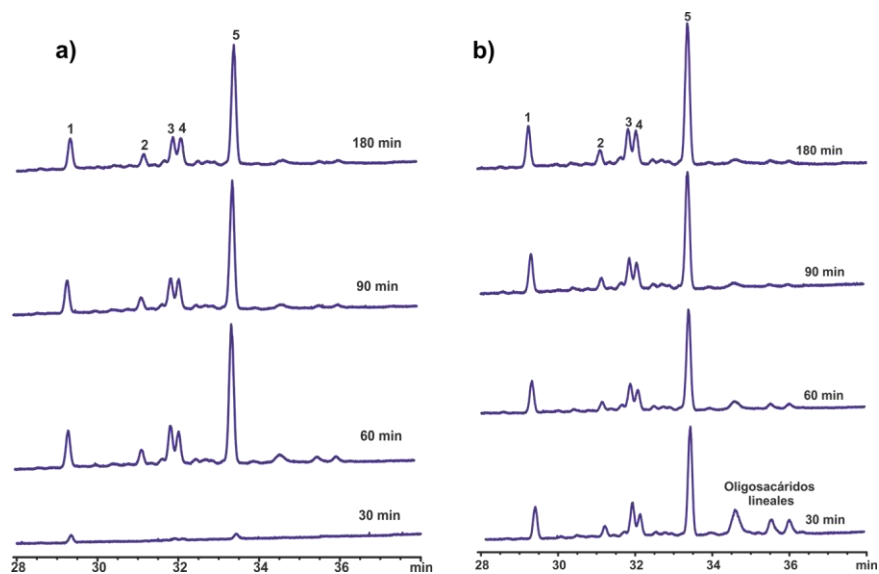


Figura 3.42. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (80%) en presencia de resina Lewatit S2328 (H⁺) (10%) empleando activación por MW a 100W (a) y 200 W (b). Región de los dianhidridos de Palatinosa[®] a 15, 30, 60, 120 y 240 min.

En la Figura 3.43, se muestra el perfil cromatográfico para la caramelización de la Palatinosa[®] utilizando SAS (10%) como catalizador e irradiación por microondas a 200W. Los resultados indican que el uso de SAS conduce a conversiones más rápidas que la resina Lewatit[®] S2328 alcanzándose la máxima proporción de dianhidridos de al cabo de 1 h. Sin embargo, tiempos más largos conducen a una disminución drástica de su proporción posiblemente debido a su transformación en oligosacáridos superiores.

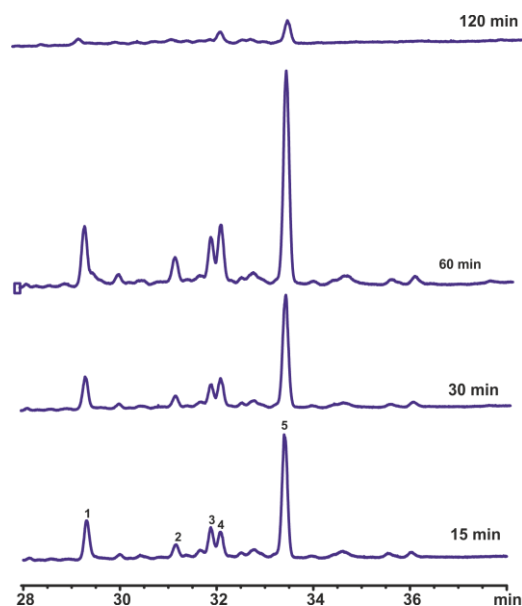


Figura 3.43. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa[®] (80%) en presencia de sílica ácida SAS (10%) empleando activación por MW a 200 W. Región de los dianhidridos de Palatinosa[®] a 15, 30 y 60 min.

Utilizando la resina SAS, los valores de conversión de la Palatinosa[®] fueron del 89% y 92%, para potencias de irradiación de 100 W y 200 W, respectivamente (Figuras 3.44 y 3.45). Sin embargo, la proporción de dianhidridos de Palatinosa[®] fue baja (menores del 10%) lo que sugiere que la formación de oligosacáridos está favorecida con este catalizador.

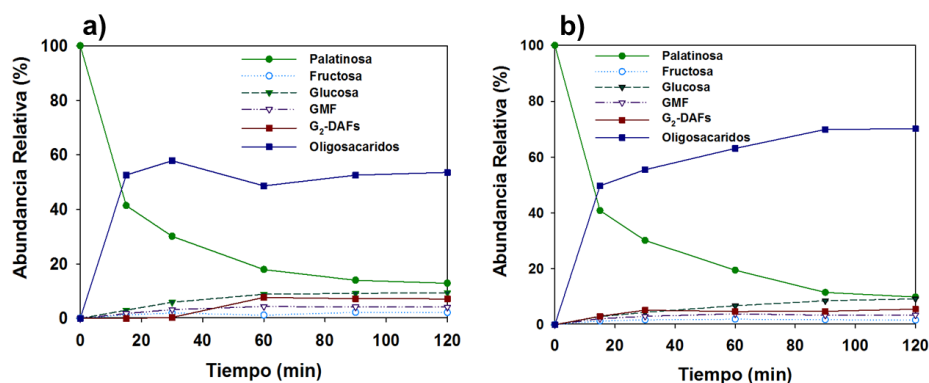


Figura 3.44. Variaciones de las proporciones relativas de Palatinosa®, dianhidridos de Palatinosa®, G-HMF y oligosacáridos superiores durante la caramelización de Palatinosa® (80%) en presencia de resina Lewatit S2328 (H⁺) (10%) empleando activación por MW 100W (a) y 200 W (b).

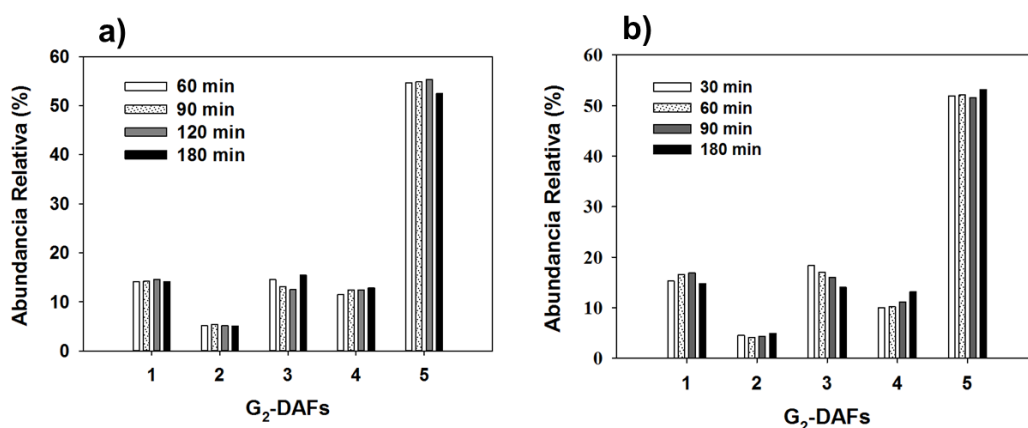


Figura 3.45. Variaciones de las proporciones de dianhidridos de Palatinosa® durante la caramelización de Palatinosa® (80%) en presencia de resina Lewatit S2328 (H⁺) (10%) empleando activación por MW a 100W (a) y 200 W (b).

La comparación de los espectros de EM (ESI) de los caramelos obtenidos por irradiación con microondas usando resina Lewatit® S2328 y sílica SAS en las mismas

condiciones (10% de catalizador, 200 W de potencia) confirman la mayor tendencia a la formación de oligómeros superiores en el segundo caso (Figura 3.46).

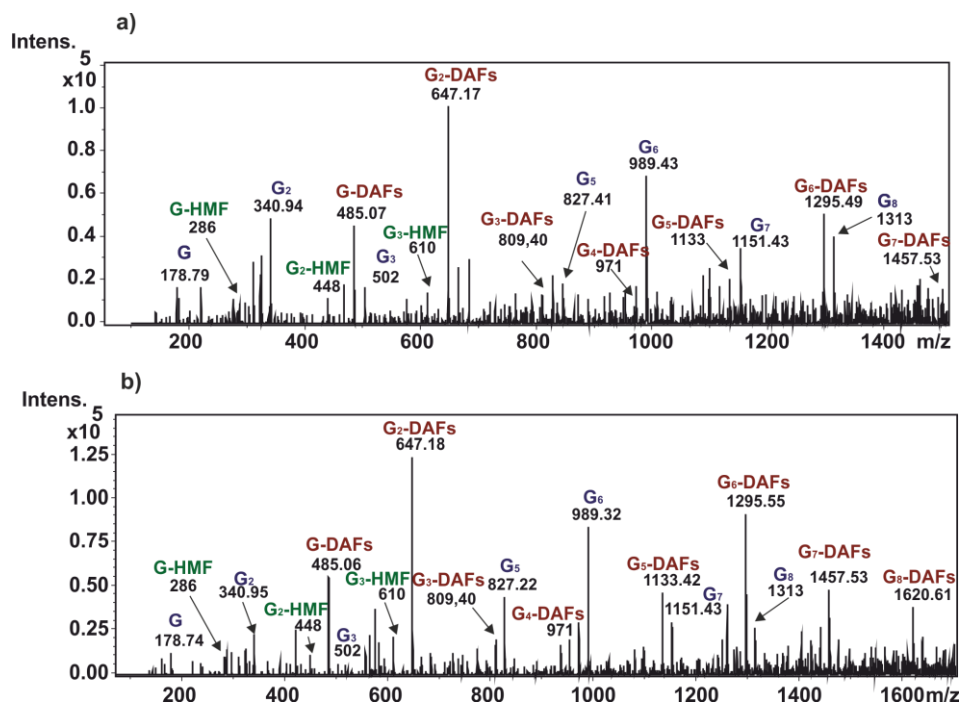


Figura 3.46. Espectro de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa[®] (80%) mediante activación por MW a 200W en presencia de resina Lewatit S2328 (H⁺) (10%) (a) y sílica ácida SAS (10%) (b).

3.5.6. Caramelización de la Palatinosa[®] con ácido cítrico a presión reducida

Con objeto de comparar los resultados en la caramelización de la Palatinosa[®] en condiciones heterogéneas con los que se obtienen en condiciones homogéneas, hemos llevado a cabo ensayos utilizando ácido cítrico y resina Lewatit[®] S2328 (H⁺) como catalizador¹⁵. Para ello partimos de una disolución de Palatinosa[®] (5 g en 1.5 mL de agua) a 105 °C, se añadió ácido cítrico (0,15-3,0 g) y se concentró a presión reducida durante 30 min a 135 °C. En la Figura 3.47, se muestra el cromatograma correspondiente a una alícuota de la mezcla y una ampliación de la región correspondiente a los dianhidridos de

Palatinosa[®]. El dianhidrido **5** es el compuesto mayoritario seguido del dianhidrido simétrico **3**. La elevada proporción relativa de este último indica que se trata de condiciones de reacción cinéticas. La fracción de dianhidridos de Palatinosa[®] supone aproximadamente el 40%, superior a lo que se alcanza con los catalizadores heterogéneos, posiblemente debido a que en este caso la formación de oligosacáridos superiores sea más lenta.

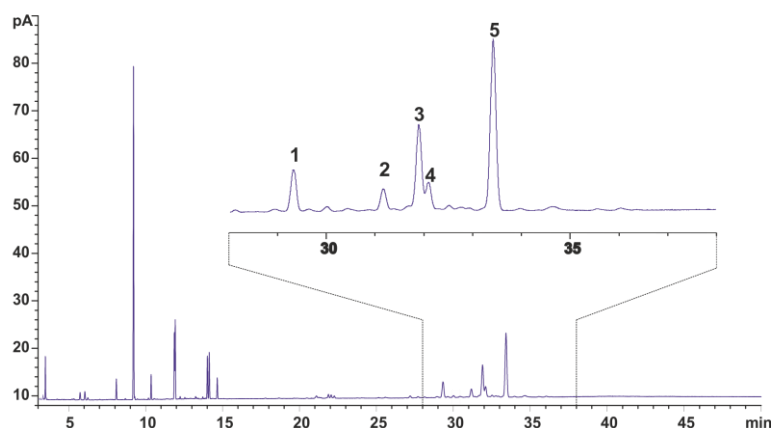


Figura 3.47. Cromatograma GC-FID de la caramelización de Palatinosa[®] (5 g en 1.5 mL) a 135 °C en presencia de ácido cítrico (0,15 g) a presión reducida durante 30 min.

Es interesante destacar que la intensidad del pico correspondiente al compuesto G-HMF representa aproximadamente un 14% mientras que en los ensayos anteriores con catalizadores heterogéneos su proporción se mantenía inferior al 5%.

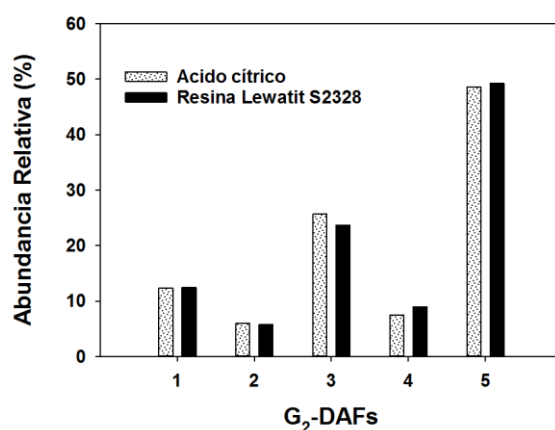


Figura 3.48. Variaciones de las proporciones de dianhidridos de Palatinosa[®] en la caramelización de Palatinosa[®] (5 g en 1.5 mL) a 135 °C durante 30 min en presencia de ácido cítrico (0,15 g) y resina Lewatit S2328 (H⁺) (10%) a presión reducida.

En el espectro de EM-ESI se identificaron los picos pseudomeculares [M-Na]⁺ (Figuras 3.49).

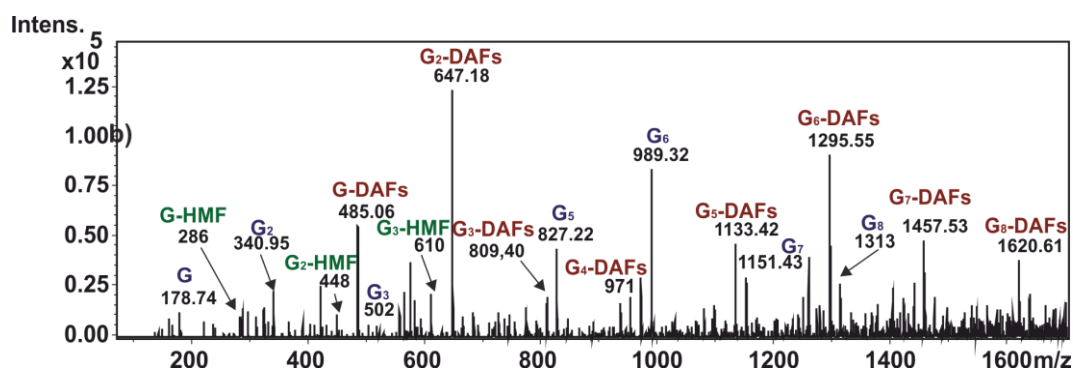


Figura 3.49. Espectro de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa[®] (5 g en 1.5 mL) a 135 °C con ácido cítrico (0,15g) durante 30 min a presión reducida.

En conclusión, los resultados obtenidos en este capítulo muestran que el uso de catalizadores heterogéneos (resina ácida, zeolitas o sílicas modificadas) permite realizar de manera eficaz la conversión de la Palatinosa[®] en una mezcla de dianhidridos de Palatinosa[®] y oligosacáridos superiores por calentamiento clásico a temperaturas moderadas o por irradiación con microondas. Seleccionando el tipo de catalizador y las condiciones de reacción es posible modular la composición del producto final. Por otra parte, el uso de ácido cítrico como catalizador homogéneo conduce a proporciones más elevadas de dianhidridos de Palatinosa, en detrimento de los oligosacáridos superiores.

3.6. Aplicación de la cromatografía de intercambio iónico de alta resolución al análisis de caramelos de Palatinosa[®]

Se han propuesto varias técnicas cromatográficas eficaces para la separación y análisis de carbohidratos en los alimentos, aunque todas presentan desventajas ocasionales.³⁴ La cromatografía de gases (GC) permite un poder de separación importante de las señales con resoluciones aceptables.³⁵⁻³⁶ Su desventaja es que necesita un tratamiento previo de las muestras, lo que implica una manipulación que puede aumentar los errores en la determinación. Por otra parte, la HPLC presenta dificultades para la separación de carbohidratos con el mismo peso molecular que se hacen más evidentes cuando aumenta el grado de oligomerización.

En esta Tesis se ha explorado la cromatografía de intercambio iónico de alta eficacia (HPAEC) con detección amperométrica de pulso (PAD) para el análisis de caramelos de Palatinosa[®]. Esta técnica ha demostrado ser una herramienta muy útil para el análisis cualitativo y cuantitativo de mono, oligo y polisacáridos, así como de oligosacáridos homólogos. Este método cromatográfico no requiere derivatización previa y precisa de un tratamiento previo muy simple de la muestra.³⁷⁻³⁸ Se han descrito numerosas aplicaciones de la HPAEC-PAD en el análisis de los carbohidratos en alimentos, incluyendo la evaluación de la composición y estimación nutricional de un componente alimenticio,

aplicaciones en el procesamiento de alimentos, control del origen de alimentos, autenticidad y eventuales adulteraciones o el seguimiento de un producto durante su almacenamiento, entre otras.³⁹⁻⁴⁰

La HPAEC es un método de separación de iones de carga del mismo signo por elución en una columna empaquetada con resina finamente dividida. En nuestro caso, el cromatógrafo iónico consta de un sistema Autosampler (AS Autosample), una bomba iPump, un módulo de depósito y degasificación de eluyentes y un detector amperométrico de pulso (PAD) (Figura 3.50). En todos los estudios se ha utilizado una Columna Hamilton RCX-30 Anion con una precolumna Metrosep CO₃ Trap 1 100/4. Los eluyentes utilizados para el análisis de carbohidratos fueron disoluciones acuosas de NaOH (eluyente A) e NaOH-AcONa (eluyente B). El método analítico desarrollado en esta Tesis se describe a continuación:

- Composición del eluyente A: 100 mM NaOH
- Composición del eluyente B: 100 mM NaOH – 500 mM AcONa.
- Gradiente: 95% A+5% B (10 min), 92% A+8% B (30 min, tipo cóncavo 4), 100% B (10 min, tipo cóncavo 1), 100%B (5 min, lineal) y 95% A+5% B (15 min, lineal) Figura 7.1.
- Tiempo total de adquisición 70 min.
- Inyección 1 µL.

Las disoluciones de las sustancias patrones y de las muestras fueron preparadas por pesada en balanza (Mettler AE240) de cantidades comprendidas entre 5-10 mg y posterior disolución en agua ultrapura de calidad milli Q (Millipore, Waters).

Aunque la cromatografía de intercambio aniónico no es una técnica comúnmente asociada al análisis de hidratos de carbono neutros, muchos carbohidratos son ácidos débiles con valores de pKa con intervalo de 12-14. Por tanto, a valores de pH elevados, sus grupos hidroxilos se transforman parcial o totalmente en oxianiones. Bajo condiciones alcalinas, los carbohidratos, incluyendo isómeros como galactosa, manosa y

glucosa (Tabla 3.3), se separan fácilmente por intercambio aniónico utilizando columnas de amonio cuaternario, estando el orden de retención creciente relacionado con la disminución del valor de pK_a .⁴¹ El acoplamiento con un detector amperométrico de pulso (PAD) permite separar los carbohidratos no derivatizados a concentraciones picomolares con una mínima preparación de la muestra por lo que el uso de la HPAC-PAD son técnicas efectivas para el análisis de carbohidratos en matrices complejas de alimentos.⁴²

Tabla 3.3. Valores de pK_a de algunos azúcares.

Azúcar	pK_a
Fructosa	12.03
Manosa	12.08
Xilosa	12.15
Glucosa	12.28
Galactosa	12.39

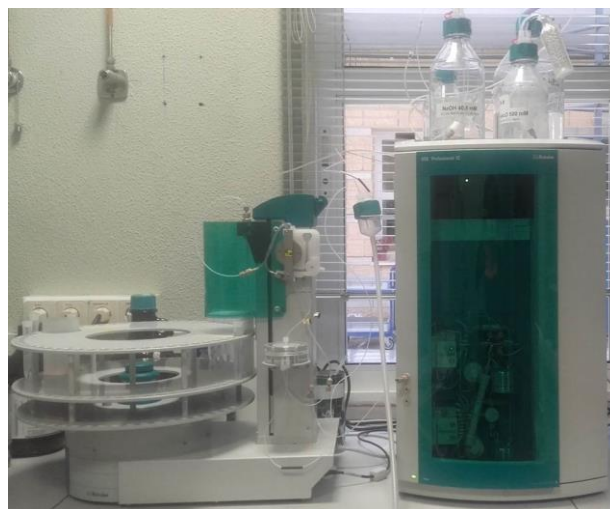


Figura 3.50. Equipo empleado para el análisis de los caramelos mediante HPAEC-PAD.

El uso de la HPAEC-PAD se presenta, por tanto, como una alternativa atractiva en términos de comodidad y sensibilidad para el análisis de caramelos de palatinosa. A la vista de los buenos resultados obtenidos en la separación de DAFs mediante esta

técnica, nos planteamos la implementación de un método adecuado para el análisis de oligosacáridos superiores.

Determinación de tiempos de retención y factores de respuesta. En primer lugar se llevó a cabo un estudio sistemático de los tiempos de retención y factores de respuesta de la Palatinosa[®] y del dianhidrido de Palatinosa[®] **5** utilizando patrones puros. A modo de ejemplo, en la Figura 3.51 se muestra el cromatograma HPAEC-PAD para el glicosil-DAFs **5** a diferentes concentraciones. A partir de estos datos se construyeron las correspondientes rectas de calibrado (Figura 3.52 y Tabla 3.4),.

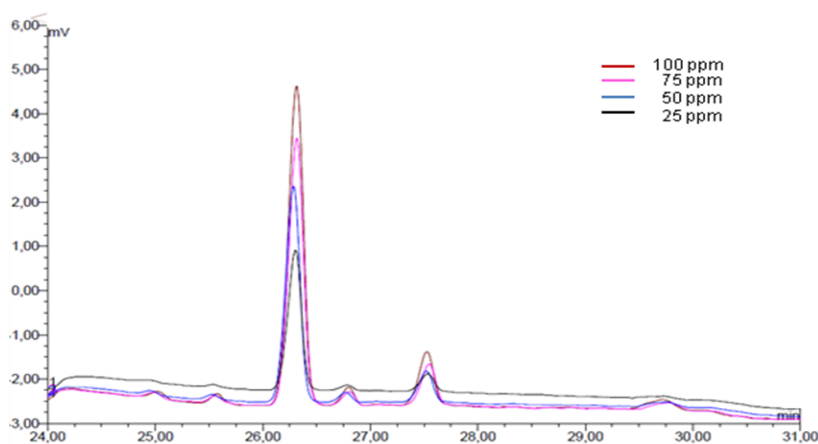


Figura 3.51. Cromatogramas HPAEC-PAD obtenidos para el dianhidrido de Palatinosa[®] **5** a diferentes concentraciones.

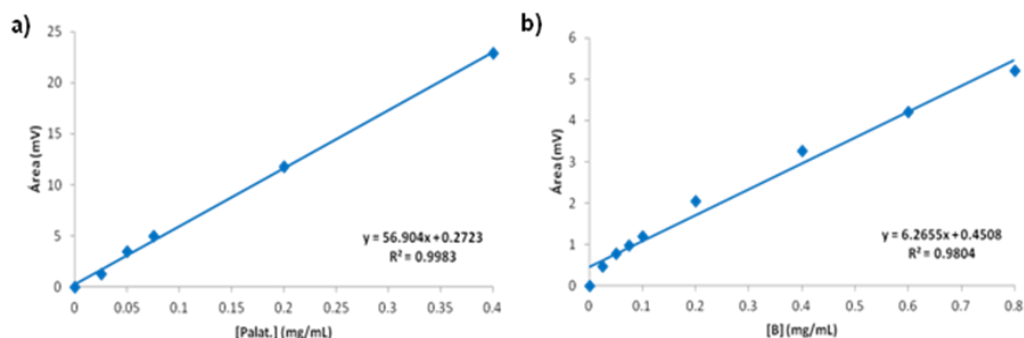


Figura 3.52 Rectas de calibrado correspondientes al análisis mediante HPAEC-PAD de la Palatinosa[®] (a) y del dianhidrido de Palatinosa[®] (5) (b).

Tabla 3.4. Ecuaciones derivadas de las rectas de calibrado de la Palatinosa[®] y del dianhidrido de Palatinosa[®] (5) mediante HPAEC-PAD.

Compuestos	Recta de Calibrado ($Y = a + bX$)	R ²
Palatinosa [®]	$Y = 0.2723 + 56.904 X$	0.998
$\alpha f, \beta f$ 1,2':2,1' (5)	$Y = 0.4508 + 6.2655 X$	0.980

*Y = área (mV); y X = concentración del compuesto (mg/mL)

Análisis de caramelos de Palatinosa[®] mediante HPAEC-PAD. No hemos encontrado antecedentes de aplicación de la técnica HPAEC-PAD a la identificación y separación de dianhidridos de Palatinosa. Con objeto de poner a punto un método adecuado, hemos estudiado en primer lugar la separación de los componentes de mezclas de glicosil-DAFs de composición definida, obtenidas mediante activación de la Palatinosa[®] con poli(fluoruro de hidrógeno) piridinio¹⁷. El método demostró ser adecuado, permitiendo una separación eficaz de los diferentes componentes como se muestra en la Figura 3.53. En las Figuras 3.54 y 3.55 se recogen los cromatogramas HPAEC-PAD correspondientes al caramelo de Palatinosa[®] preparado a partir de disoluciones al 80% y 90% de Palatinosa[®], respectivamente, con un 20% de resina

Lewatit S2328 (H^+) a 90 °C, utilizando el método previamente optimizado para la separación de glicosil-DAFs.

Los cromatogramas muestran picos correspondientes a los dianhidridos de Palatinosa **1-5** con tiempos de retención entre 24 y 32 minutos. Los tiempos de retención más cortos corresponden a la glucosa (0-5 minutos) y la Palatinosa® (15-20 minutos) observándose, además, otros picos que no pudieron identificarse a tiempos de retención relativamente bajos (>5 minutos).

En conclusión, la HPAEC-PAD permita la separación de los dianhidridos de Palatinosa® sin necesidad de derivatización previa de la muestra. El método permite evaluar rápidamente la conversión y las proporciones relativas de los dianhidridos de Palatinosa® presentes.

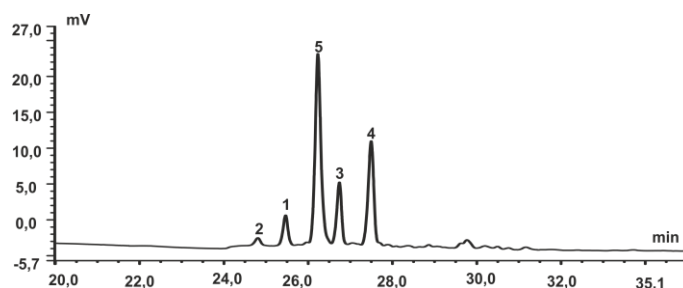


Figura 3.53. Cromatogramas HPAEC-PAD del producto obtenido por tratamiento de Palatinosa® con HF-piridina (7:3) a 20 °C durante 60 min (crudo de reacción).

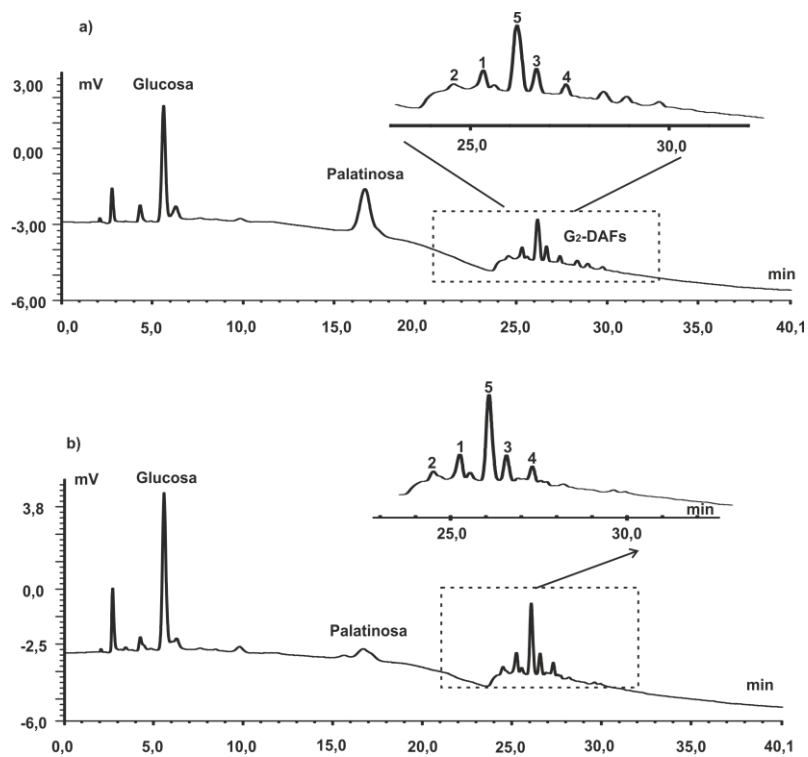


Figura 3.54. Cromatogramas HPAEC-PAD del producto obtenido por tratamiento de Palatinosa[®] (80%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit[®] S2328 (H⁺) (20%) durante 30 min (a) y 120 min (b).

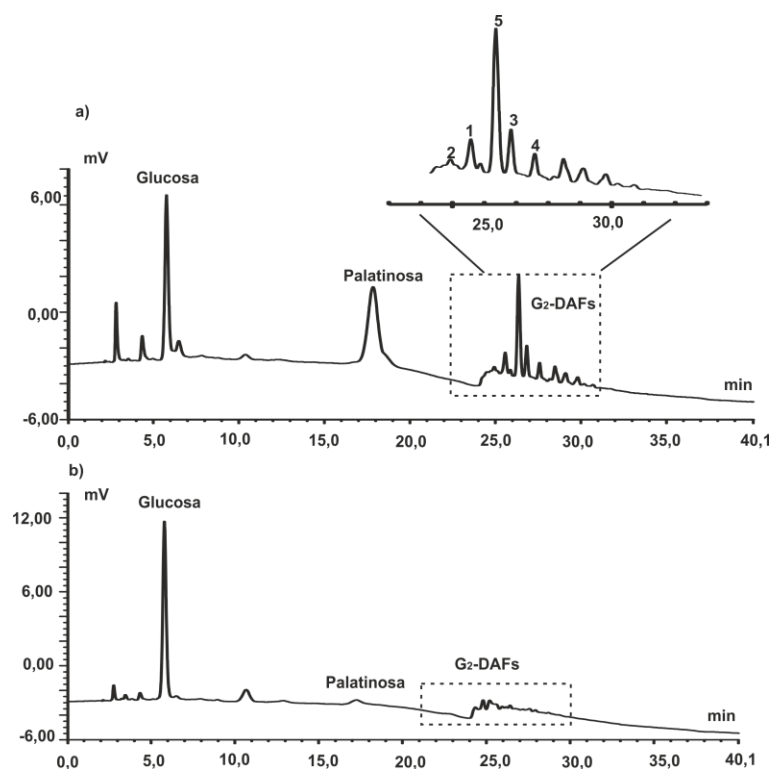


Figura 3.55. Cromatogramas HPAEC-PAD del producto obtenido por tratamiento de Palatinosa[®] (90%) a 90 °C en presencia de resina Lewatit[®] S2328 (H⁺) (20%,) durante 30 min (a) y 120 min (b).

Bibliografía

1. Holub, I.; Gostner, A.; Theis, S.; Nosek, L.; Kudlich, T.; Melcher, R.; Scheppach, W., *The British journal of nutrition*, **2010**, *103*, 1730-7.
2. Panesar, P. S.; Bali, V., *Encyclopedia of Food and Health*, **2016**, 464-471.
3. Lina, B. A. R.; Jonker, D.; Kozianowski, G., *Food Chem. Toxicol.*, **2002**, *40*, 1375-1381.
4. McNutt, K.; Sentko, A., *Isomalt*, **2003**, 3401-3408.
5. Kashimura, J.; Nagai, Y., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **2007**, *53*, 87-89.
6. Young, H.; Benton, D., *Eur. J. Nutr.*, **2014**, 1-8.
7. Tonouchi, H.; Yamaji, T.; Uchida, M.; Koganei, M.; Sasayama, A.; Kaneko, T.; Urita, Y.; Okuno, M.; Suzuki, K.; Kashimura, J.; Sasaki, H., *Br. J. Nutr.*, **2011**, *105*, 10-14.
8. Kashimura, J.; Nagai, Y.; Ebashi, T., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **2003**, *49*, 214-216.
9. Benton, D.; Maconie, A.; Williams, C., *Physiol. Behav.*, **2007**, *92*, 717-724.
10. Ingwersen, J.; Defeyter, M. A.; Kennedy, D. O.; Wesnes, K. A.; Scholey, A. B., *Appetite*, **2007**, *49*, 240-244.
11. Mohd Taib, M. N.; Mohd Shariff, Z.; Wesnes, K. A.; Abu Saad, H.; Sariman, S., *Appetite*, **2012**, *58*, 81-87.
12. Kazusa, S.; Hidekazu, A.; Akira, M.; Makiko, F.; Tadatoshi, S.; Megumi, K.; Hajime, S.; Hironori, Y.; Yutaka, T.; Toshio, D.; Eiji, T., *J. Nutr.*, **2007**, *137*, 1908-1915.
13. Tanaka, M.; Nakajima, Y.; Nishio, K.; Hashimoto, H., *J. Carbohydr. Chem.*, **1993**, *12*, 49-61.
14. Kashimura, J.; Nakajima, Y.; Benno, Y.; Endo, K.; Mitsuoka, T., *Bifidobacteria and Microflora*, **1989**, *8*, 45-50.
15. Klingeberg, M. K., M.; Looft, J.; Dierk, M.; Mohammed, M., Manfred V., *Patent US 2005/0238777 A1*, **2005**.
16. Defaye, J.; Gadelle, A.; Pedersen, C., *Carbohydr. Res.*, **1985**, *136*, 53-65.
17. Defaye, J.; Garcia Fernández, J. M., *Carbohydr. Res.*, **1992**, *273*, 223-247.
18. Defaye, J.; Garcia Fernandez, J. M., *Carbohydr. Res.*, **1994**, *256*, C1-C4.
19. Benito, J. M.; Rubio, E.; Gómez-García, M.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M., *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 5899-5906.
20. Tan, J. N.; Ahmar, M.; Queneau, Y., *Curr. Org. Chem.*, **2014**, *18*, 1768-1787.
21. Lichtenthaler, F. W.; Martin, D.; Weber, T.; Schiweck, H., *Liebigs Annalen der Chemie*, **1993**, 967-974.

22. Curtius, H. C.; Müller, M.; Völlmin, J. A., *J. Chromatogr. A.*, **1968**, *37*, 216-224.
23. Harvey, D. J., *J. Chromatogra. B*, **2011**, *879*, 1196-1225.
24. Ratsimba, V.; García Fernández, J. M.; Defaye, J.; Nigay, H.; Voilley, A., *J. Chromatogr. A.*, **1999**, *844*, 283-293.
25. Rubio Castillo, E. M.; Gomez-García, M.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Zarzuelo Zurita, A.; Gálvez Peralta, J. J.; Duval, R., *ES Patent WO2008107506 (A1)*. **2008**.
26. Suárez-Pereira, E.; Rubio, E. M.; Pilard, S.; Ortiz Mellet, C.; Garcia Fernández, J. M., *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58*, 1777-87.
27. Maleki, B., *Inter J. Org. Chem.*, **2012**, *02*, 93-99.
28. Sawant, A. D.; Raut, D. G.; Deorukhkar, A. R.; Desai, U. V.; Salunkhe, M. M., *Green Chemistry Letters and Reviews*, **2011**, *4*, 235-240.
29. Hansen, T. S.; Woodley, J. M.; Riisager, A., *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 2568-2572.
30. Li, X.-M.; Le, G.-W.; Cheng, J.-X.; Wang, F.; Shi, Y.-H., *Carbohydr. Polym.*, **2006**, *64*, 408-418.
31. Ferroud, C.; Godart, M.; Ung, S.; Borderies, H.; Guy, A., *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 3004-3008.
32. Maiti, M.; Kaith, B. S.; Jindal, R.; Jana, A. K., *Polymer Degradation and Stability*, **2010**, *95*, 1694-1703.
33. Idri, I.; Havet, J.-L.; García Fernández, J. M.; Ferroud, C.; Porte, C., *Food Chemistry*, **2012**, *134*, 1527-1532.
34. Molnár-Perl, I., *J. Chromatogr. A*, **2000**, *891*, 1-32.
35. Nikolov, Z. L.; Reilly, P. J., *J. Chromatogr. A*, **1983**, *254*, 157-162.
36. Selosse, E. J. M.; Reilly, P. J., *J. Chromatogr. A*, **1985**, *328*, 253-258.
37. Paskach, T. J.; Lieker, H.-P.; Reilly, P. J.; Thielecke, K., *Carbohydr. Res.*, **1991**, *215*, 1-14.
38. Hughes, S.; Johnson, D. C., *Anal. Chim. Acta*, **1981**, *132*, 11-22.
39. Corradini, C.; Cavazza, A.; Bignardi, C., *Inter. J. Carbohydr. Chem.*, **2012**, *2012*, 13.
40. Pico, J.; Martínez, M. M.; Martín, M. T.; Gómez, M., *Food Chemistry*, **2015**, *173*, 674-681.
41. Corradini, C.; Bianchi, F.; Matteuzzi, D.; Amoretti, A.; Rossi, M.; Zanoni, S., *Journal of Chromatography A*, **2004**, *1054*, 165-173.
42. Martínez, C.; Rodríguez, M. C.; Guillén, D. A.; Barroso, C. G., *Chromatographia*, **2004**, *59*, 15-30.

4, REACCIÓN DE CARMELIZACIÓN DE D-FRUCTOSA,
D-GLUCOSA Y D-MANOSA EMPLEANDO CATALIZADORES
HETEROGÉNEOS



4. Reacción de caramelización de D-fructosa, D-glucosa y D-manosa empleando catalizadores heterogéneos.

Trabajos anteriores del grupo de investigación habían puesto de manifiesto la eficacia de las resinas ácidas de intercambio iónico, como la resina Lewatit® S2328, para promover la caramelización de la D-fructosa y la D-glucosa, favoreciendo al mismo tiempo la formación de DAFs y glicosil-DAFs en el primer caso y de glucooligosacáridos de reversión en el segundo. Los caramelos resultantes, enriquecidos en DAFs y/o oligosacáridos, mostraron propiedades prebióticas en diferentes modelos animales. En el capítulo anterior de esta Tesis esta metodología se ha extendido a la Palatinosa®, lo que nos ha permitido obtener caramelos enriquecidos en “dianhidridos de Palatinosa” y otros glicosil-DAFs. Además, se comprobó que los ácidos sulfúrico y fosfórico soportados sobre sílica son también catalizadores adecuados para realizar esta transformación. En este capítulo hemos abordado el estudio de estas sílicas modificadas para la preparación de caramelos de fructosa y glucosa así como la preparación de caramelos enriquecidos en oligosacáridos de manosa, a partir de manosa, mediante una estrategia similar. La motivación principal en este caso es, igualmente, el potencial de los oligómeros de manosa, incluyendo oligosacáridos y polisacáridos, como prebióticos.

4.1. Caramelización de D-fructosa utilizando sílicas modificadas

En primer lugar nos pareció interesante comprobar la eficacia de estos catalizadores heterogéneos en la caramelización de la D-fructosa y su posible aplicación a la obtención de productos con diferentes perfiles oligosacarídicos

4.1.1. Reacciones de caramelización de D-fructosa empleando sílica $H_2SO_4 \cdot SiO_2$ (SAS)

Se ha llevado a cabo un estudio cinético de la caramelización de la D-fructosa promovida por la sílica ácida SAS, utilizando disoluciones concentradas en agua desionizada (80% y 90% p/v). Se ha estudiado además la influencia de la proporción de catalizador y de la temperatura. En la Parte Experimental se recogen los datos de condiciones de reacción empleados. En todos los casos se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo para su análisis mediante cromatografía de gases, tras oximación-sililación de las muestras.

El análisis mediante cromatografía de gases de los caramelos de D-fructosa al 80% y 90% mostró la presencia de picos correspondientes a los DAFs, con tiempos de retención comprendidos entre 11 y 16 min. Los compuestos mayoritarios observados en ambos casos fueron los DAFs diespiránicos **9** ($\alpha\beta p$) y **10** ($\alpha\beta f$), observándose una disminución con el tiempo de la proporción relativa de este último así como de la del DAF **7** ($\alpha\alpha f$). (Figuras 4.1 y 4.2). Estos resultados son acordes con la evolución hacia una distribución termodinámica de los diferentes diasterómeros. Es interesante destacar que la velocidad de conversión de la D-fructosa en DAFs y derivados oligosacáridicos es más lenta cuando se utiliza una concentración inicial del 90% (Figura 4.3.).

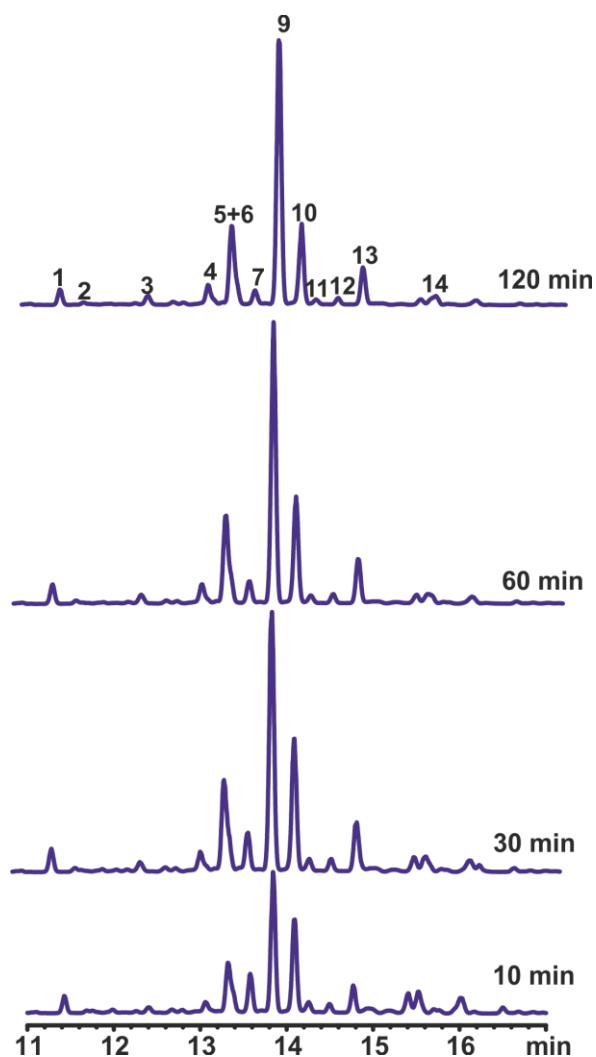


Figura 4.1. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-fructosa (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%). Región de dianhidridos de di-D-fructosa a 10, 30, 60 y 120 min.

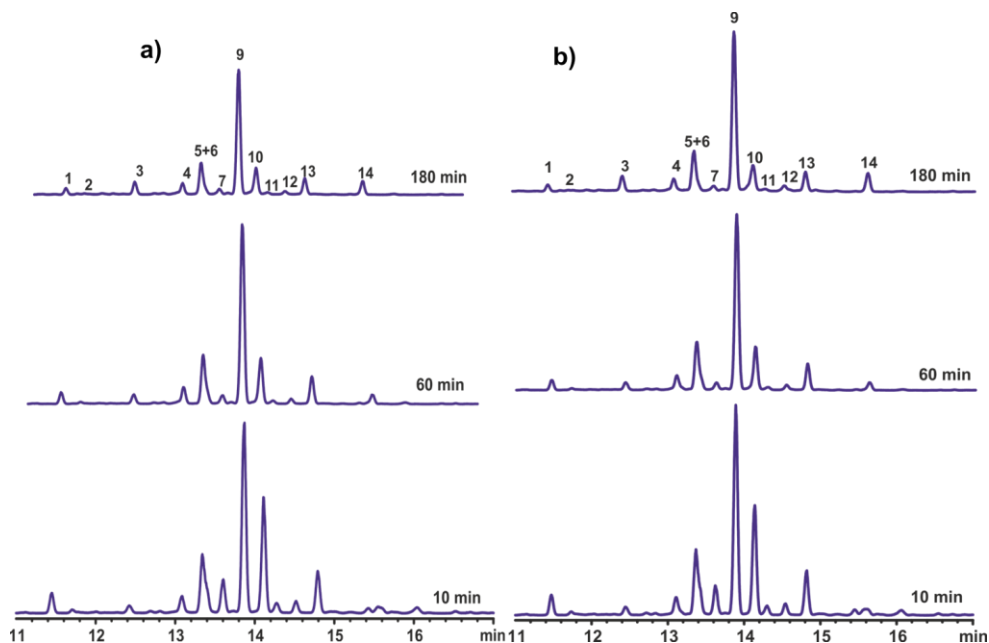


Figura 4.2. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia sílica ácida SAS (5%) (a) y (10%) (b). Región de dianhidridos de di-D-fructosa a 10, 60 y 180 min.

Aunque, en principio, la reacción de reversión está favorecida a concentraciones elevadas, el aumento de la viscosidad del medio probablemente dificulta la mezcla íntima con el catalizador heterogéneo. En cualquier caso, los resultados obtenidos al emplear concentraciones de D-fructosa al 90% fueron similares a los obtenidos a partir de disoluciones al 80%, observándose un aumento en la velocidad de conversión al aumentar la proporción de catalizador (5 y 10%; Figura 4.3.). La fracción de DAFs supone aproximadamente el 40-60% de los oligosacáridos de reversión que se forman. En el espectro de EM (ESI) del caramelo obtenido con un 90% de D-fructosa y un 5% de catalizador se detectaron picos indicando la formación de DAFs y de glicosil-DAFs (Figura 4.4.).

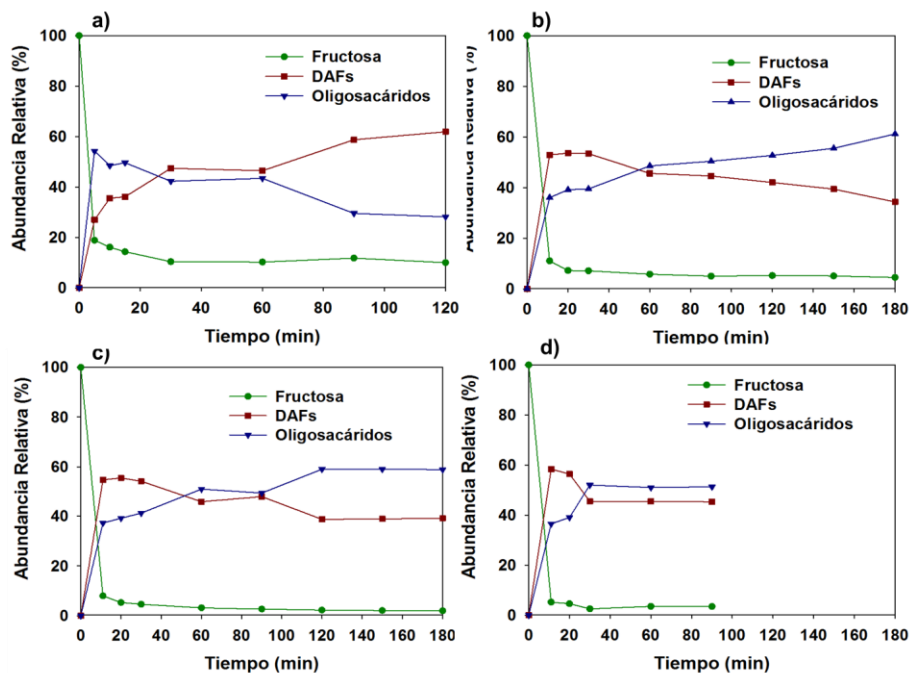


Figura 4.3. Variaciones de las proporciones relativas de D-fructosa, DAFs y oligosacáridos superiores durante la caramelización de D-fructosa (80%) a 80 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) (a) y la caramelización de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (5%) (b), (10%) (c) y (20%) (d).

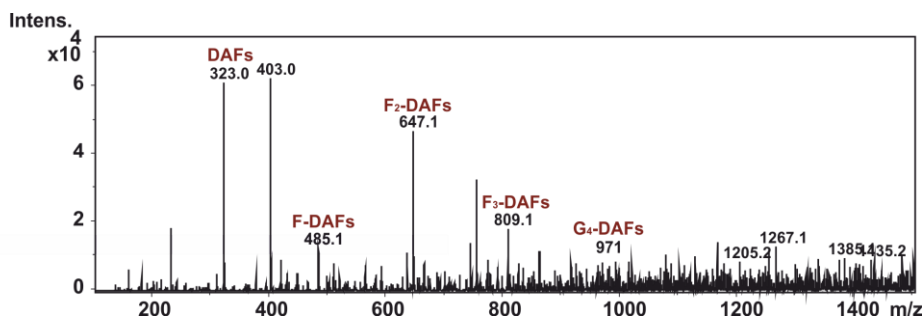


Figura 4.4. Espectros de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (5%) tras 60 min.

La distribución relativa de los DAFs obtenidos por caramelización de D-fructosa al 80% y 90% usando SAS en diferentes proporciones (5%, 10% y 20%) como catalizador, para diferentes tiempos de reacción, se muestra en la Figura 4.5. El DAF 9 es el que predomina en todos los casos, seguido del DAF 10. En general, a medida que avanza la caramelización se observa un aumento de la relación DAF 9/ DAF 10 (Figura 4.5.a). Sin embargo, cuando se utiliza un 20% del catalizador el efecto es el contrario (Figura 4.5d.), posiblemente debido a que al aumentar mucho la viscosidad de la mezcla se perturban las reacciones de dimerización e isomerización (Figura 4.5.d).

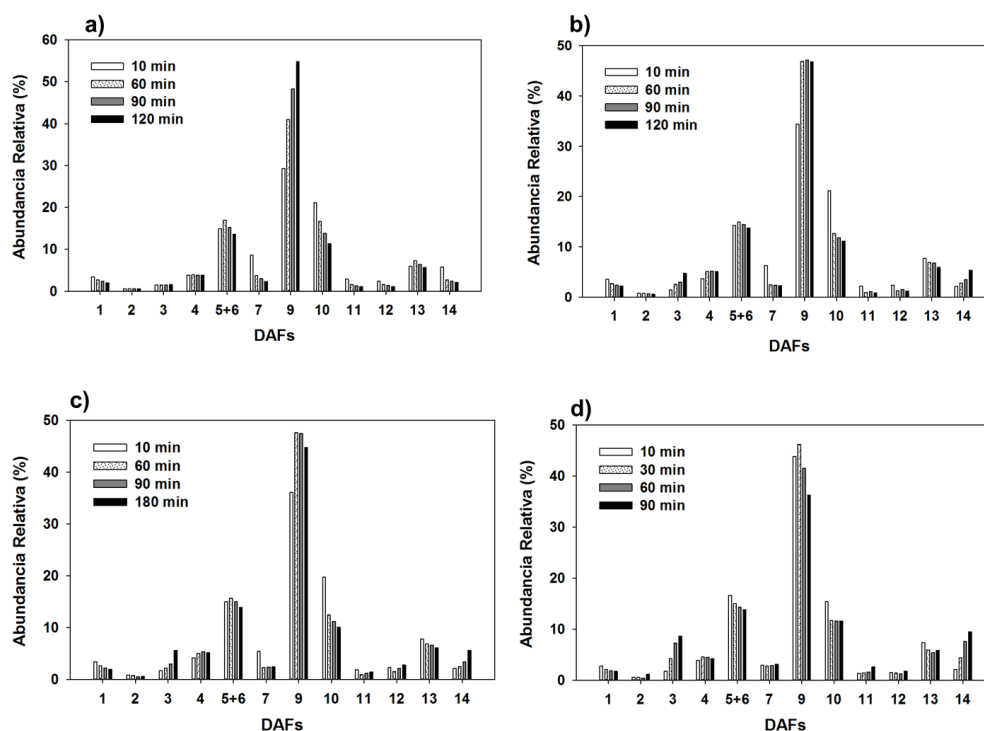


Figura 4.5. Variaciones de las proporciones relativas de DAFs durante la caramelización de D-fructosa (80%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) (a) y la caramelización de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (5%) (b), (10%) (c) y (20%) (d).

4.1.2. Reacciones de caramelización de la D-fructosa empleando sílica $H_3PO_4 \cdot SiO_2$ (SAF)

Para estudiar la eficacia de la sílica ácida $H_3PO_4 \cdot SiO_2$ (SAF) como catalizador de la reacción de caramelización de la D-fructosa se ha llevado a cabo un estudio cinético similar al descrito en el apartado anterior. En concreto se han empleado dos concentraciones de D-fructosa iniciales (80% y 90% p/v) y dos temperaturas diferentes (80 °C y 90 °C), así como dos porcentajes de catalizador (10% y 20% en peso). En la Figura 4.6., que corresponde a la caramelización de D-fructosa (80%) con sílica ácida SAF (10%) a 90 °C, se observa un progreso lento de la reacción y la formación paulatina de los DAFs. A tiempos cortos de reacción (30 min) se observa la formación de fructobiosas (t_R 15-17 min) que van desapareciendo a medida que avanza la caramelización.

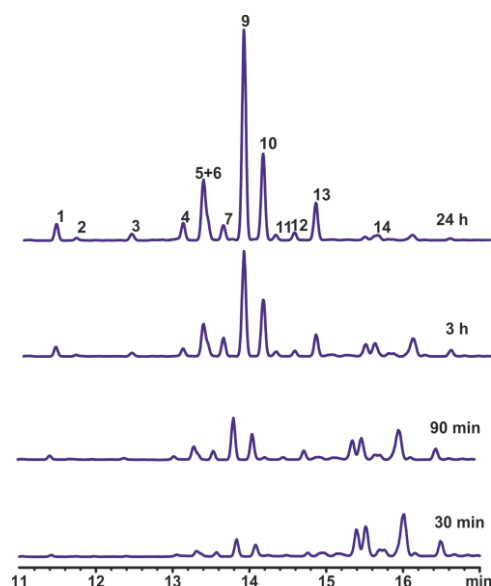


Figura 4.6. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-fructosa (80%) a 90 °C en presencia sílica ácida SAF (10%). Región de dianhidridos de di-D-fructosa a 30 minutos, 90 minutos, 3 h y 24 h.

Cuando se emplearon una concentración inicial del 90% de D-fructosa, una temperatura de 90 °C y proporciones del 10% y 20% del catalizador la caramelización fue más rápida (Figuras 4.7. a y b.). En cualquier caso, fueron necesarios tiempos de más de 1 h para que la proporción de DAFs fuese significativamente mayor que la de las fructobiosas, apuntando que la eficacia de la sílica $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ (SAF) es menor que la de la sílica $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ (SAS).

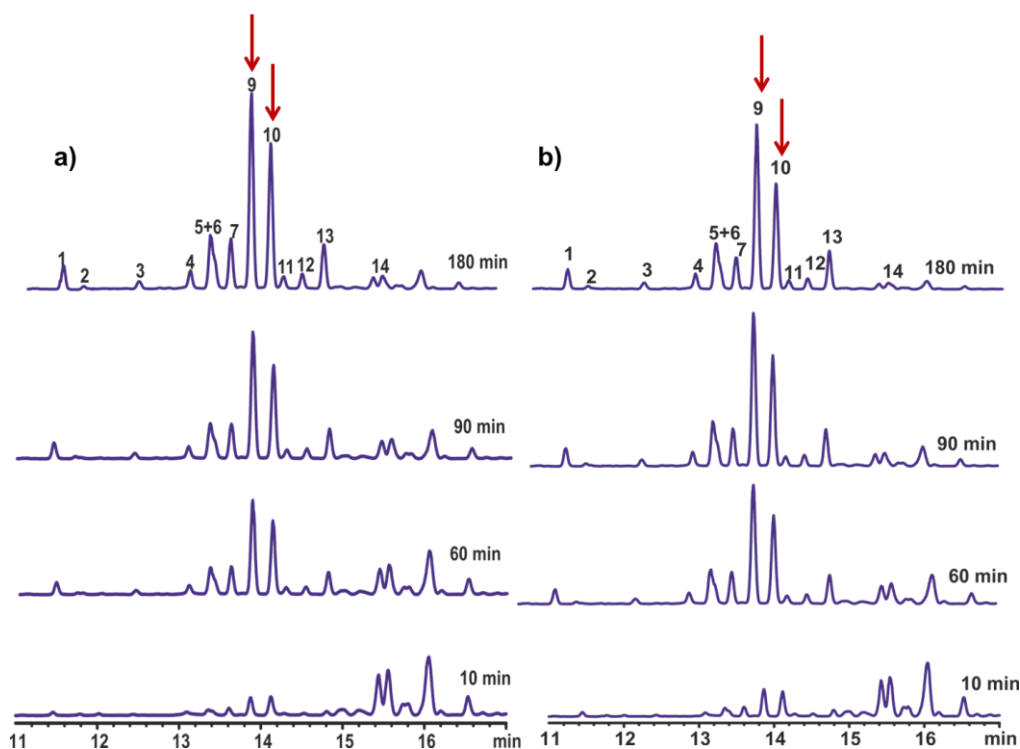
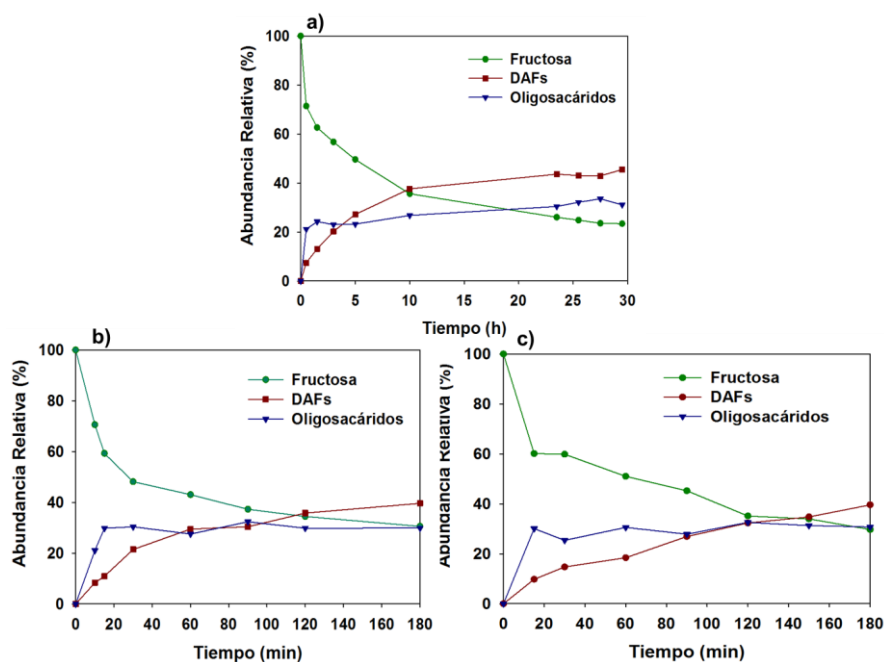


Figura 4.7. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia sílica ácida SAF (10%) (a) y (20%) (b). Región de dianhidridos de di-D-fructosa a 10, 60, 90 y 180 min.

La comparación directa de las curvas de conversión de la D-fructosa en DAFs y oligosacáridos superiores para reacciones llevadas a cabo partiendo de disoluciones iniciales del monosacárido al 80% y 90%, con un 10% de SAF, en función del tiempo muestra claramente el aumento muy significativo de la velocidad de reacción en el segundo caso (Figura 4.8 a y b). Un aumento en la proporción de DAFs, del 10% al 20%, no modifica significativamente el perfil de conversión (Figura 4.8 c). En todos los ensayos, la fracción final de DAFs supone aproximadamente un 20-30% de los oligosacáridos de reversión que se forman.



Los espectros de EM (ESI) confirmaron la formación de DAFs y, en menor proporción, de glicosil-DAFs (Figura 4.9.). Se observa también la presencia de fructooligosacáridos que no contienen el núcleo de DAF.

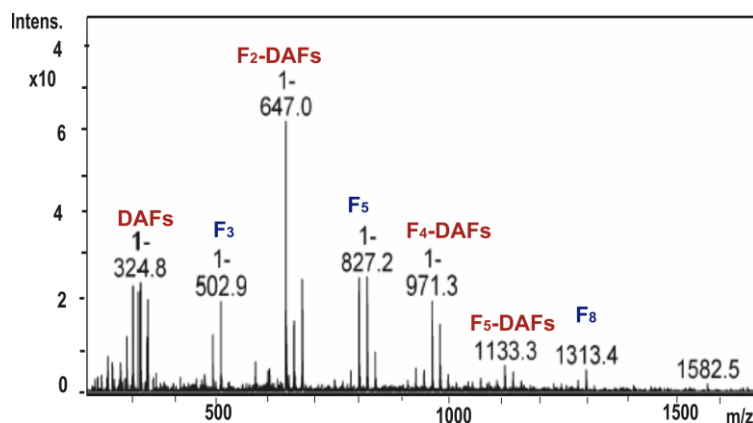


Figura 4.9. Espectros de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) tras 180 min (F_n indica unidades de fructosilo en glicosil-DAFs o en fructooligosacáridos).

A partir de los datos de GC-FID se ha determinado el perfil de la distribución relativa de los DAFs tras la caramelización de disoluciones al 80% y 90% de D-fructosa usando H₃PO₄·SiO₂ (SAF) como catalizador (10% y 20%) para diferentes tiempos de reacción (Figura 4.10). A tiempos cortos, el DAF **10**, que es el isómero de control cinético, es mayoritario. Con el avance de la reacción la proporción del diastereoisómero de control termodinámico, el DAF **9**, aumenta y pasa a ser el compuesto más abundante (Figuras 4.10 b y c.).

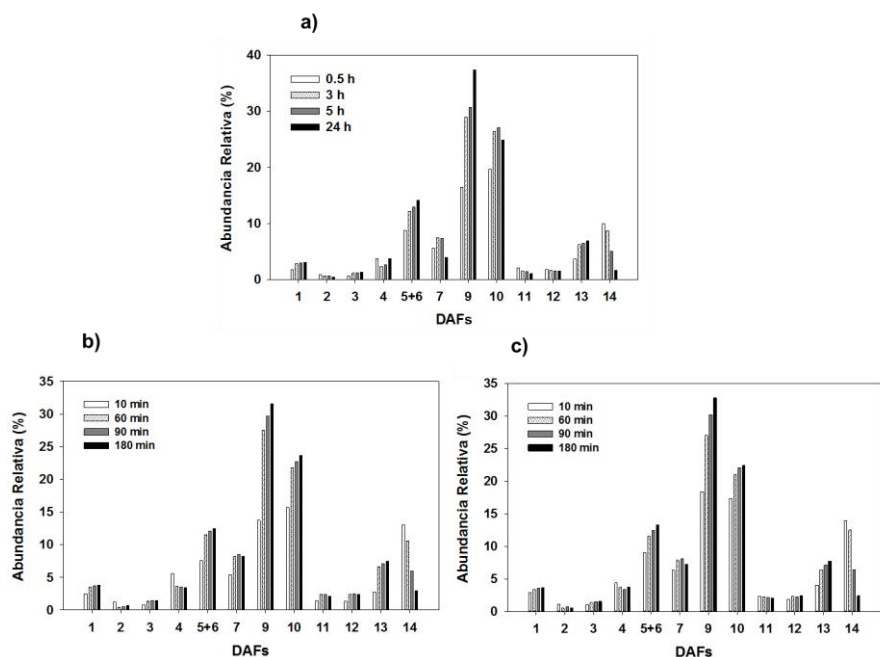


Figura 4.10. Variaciones de las proporciones relativas de DAFs durante la caramelización de D-fructosa (80%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) (a) y la caramelización de D-fructosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) (b) y (20%) (c).

4.2. Caramelización de D-glucosa utilizando sílicas modificadas

Los estudios previos llevados a cabo sobre la caramelización de la D-fructosa utilizando resinas de intercambio iónico en su forma ácida han puesto de manifiesto la analogía existente entre esta reacción y la reacción de caramelización “clásica”. La diferencia fundamental es el desplazamiento del equilibrio existente entre el monosacárido y especies oligosacáridas resultantes de reacciones de autoglicosidación y espiroacetalación hacia estas últimas. Aunque la reacción de dimerización-espiroacetalación para dar dianhidridos es característica de cetosas, en el caso de aldosas, como la glucosa, podría esperarse que se produjesen igualmente reacciones de reversión

para originar glucooligosacáridos. En una Tesis anterior del grupo de investigación se estudio la caramelización de la D-glucosa utilizando la resina de intercambio iónico ácida Lewatit® S2328 y se comprobó la formación de disacáridos de D-glucosa que, a su vez, sirven de donadores y/o aceptores para originar oligosacáridos superiores, de manera análoga a cómo sucede en la preparación de la polidextrosa mediante pirólisis en presencia de ácido cítrico. A la vista de estos resultados previos, un objetivo importante de esta Tesis ha consistido en explorar el uso de ácidos soportados por sílica de la sílica ácida ($\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ y $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{SiO}_2$), como catalizadores para esta reacción y optimizar las condiciones para obtener caramelos enriquecidos en glucooligosacáridos, que podrían comportarse como prebióticos. Como patrones para la identificación y cuantificación de componentes de estos caramelos se han empleado una serie de glucodisacáridos comerciales como patrones (Figura 4.11.).

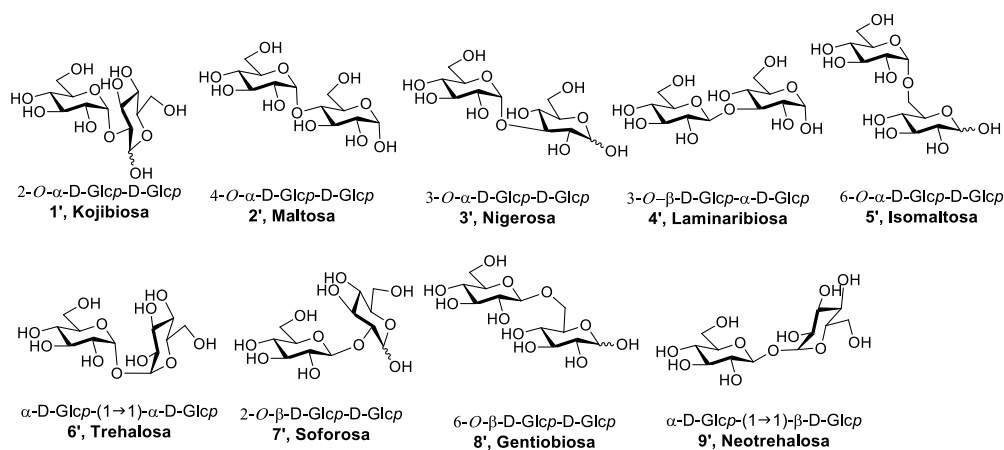


Figura 4.11. Estructura de los disacáridos de D-glucosa disponibles como patrones.

4.2.1. Reacciones de caramelización de D-glucosa empleando $H_2SO_4 \cdot SiO_2$ (SAS)

Para el estudio de la cinética de caramelización de la D-glucosa promovida por la sílica ácida $H_2SO_4 \cdot SiO_4$, se utilizó inicialmente una disolución de D-glucosa al 83% y una temperatura de reacción de 90 °C, y se han ensayado proporciones de 5%, 10% y 20% en peso (relativas al monosacárido) de sílica. La derivatización de muestras, previa a la cromatografía de gases (Figura 4.12), se realizó empleando la secuencia de oximación-acetilación, que permite identificar los aldononitrilos peracetilados correspondientes como un único pico para cada azúcar reductor (ver Parte Experimental).

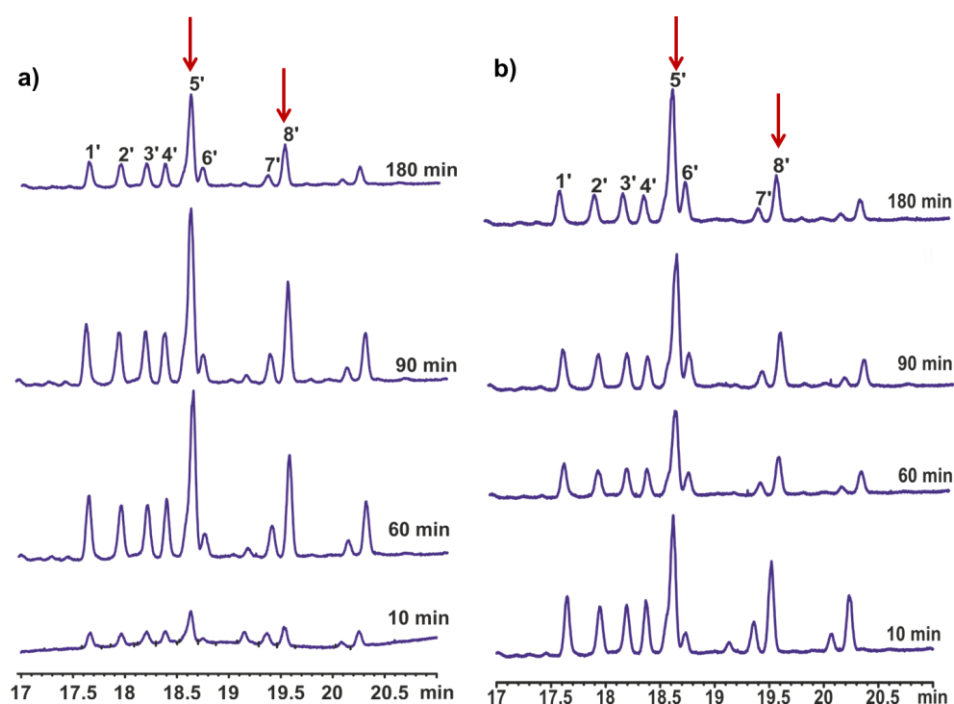
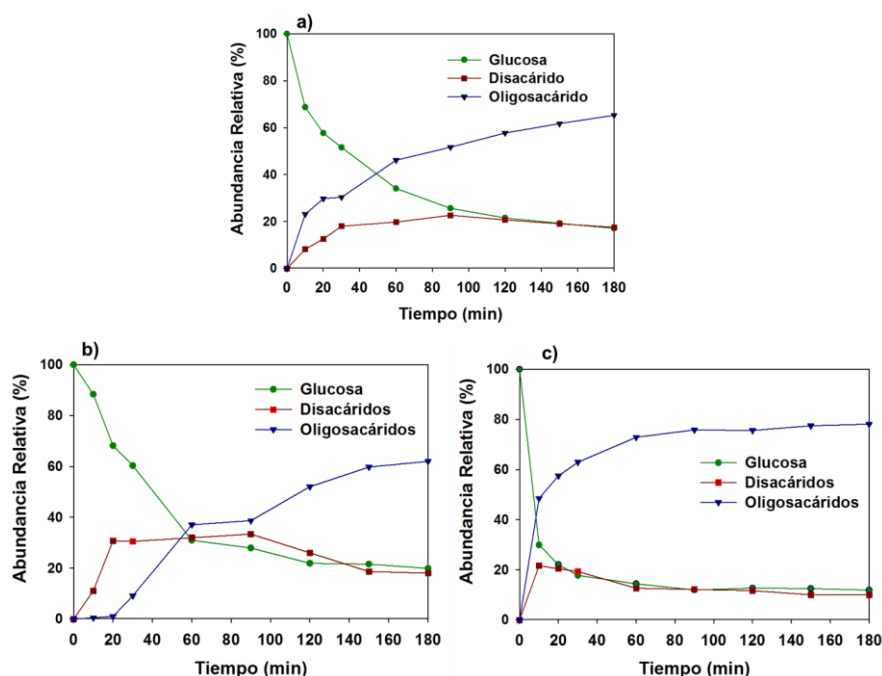


Figura 4.12. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-glucosa (83%) a 90 °C en presencia sílica ácida SAS (10%) (a) y (20%) (b). Región de disacáridos de D-glucosa a 10, 60, 90 y 180 min.

En los cromatogramas GC-FID de las muestras de caramelos se han identificado los nueve picos correspondientes a los glucodisacáridos para los que se disponía de patrones puros, con valores de tiempo de retención entre 17 y 21 minutos. En todos los casos se observa que los disacáridos con uniones (1→6) (isomaltasa y gentiobiosa) son los compuestos mayoritarios, pero la proporción entre ambos depende significativamente del tiempo de reacción (Figura 4.12.).

En la Figura 4.13 se muestran las curvas de evolución de la conversión de la D-glucosa y la formación de glucodisacáridos y oligosacáridos superiores durante la caramelización del monosacárido catalizada por SAS usando diferentes condiciones.



Se observa una mayor formación de glucodisacáridos empleando concentraciones más elevadas del azúcar de partida (90%; Figuras 4.13.b y c) y una conversión más rápida cuando se aumenta la proporción de catalizador (20%; Figura 4.13c.). Los espectros de EM (ESI) confirman la formación de los glucodisacáridos (Figura 4.14.). Como puede observarse, la formación de oligosacáridos superiores y el grado de polimerización (DP) se incrementan con el tiempo de caramelización. La fracción de los disacáridos de glucosa supone aproximadamente el 10-20% de los oligosacáridos de reversión que se forman. El perfil de la distribución relativa de los glucodisacáridos, es similar en todos los casos, siendo predominante el disacárido **5'**, isomaltasa, con enlace glicosídico α -(1 \rightarrow 6) (Figura 4.15.).

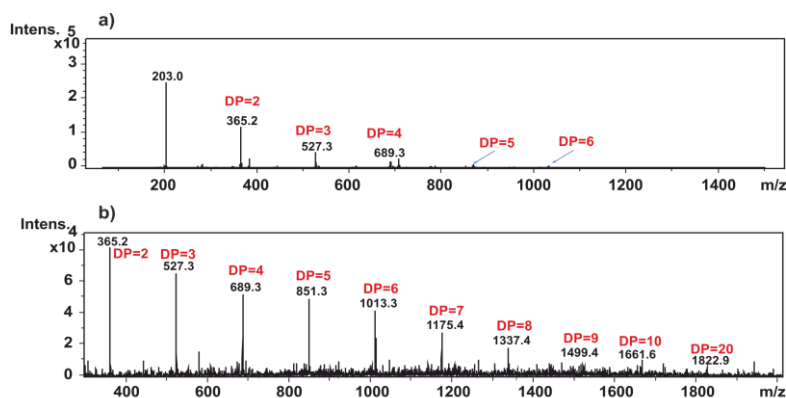


Figura 4.14. Espectros de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de una disolución de D-glucosa (83%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) tras 20 min (a) y 180 min (b).

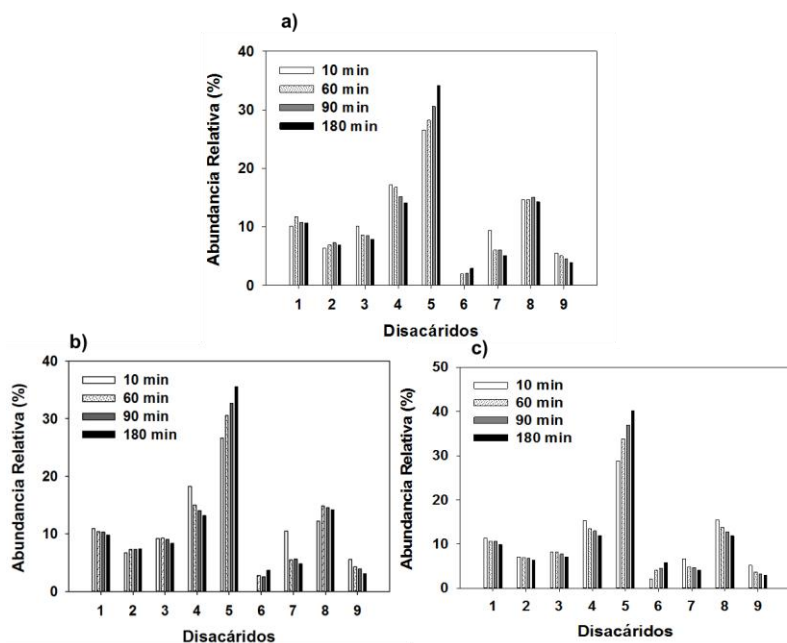


Figura 4.15. Variaciones de las proporciones relativas de los glucodisacáridos durante la caramelización de D-glucosa (80%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) (a) y la caramelización de D-glucosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (5%) (b), (10%) (c) y (20%) (d).

4.2.2. Reacciones de caramelización de D-glucosa empleando $H_3PO_4 \cdot SiO_2$ (SAF)

Para el estudio de la cinética de caramelización de la D-glucosa promovida por la sílica ácida $H_3PO_4 \cdot SiO_2$ (SAF) se ha empleado una disolución de D-glucosa al 83% a 90 °C y dos proporciones del catalizador (10% y 20%). El seguimiento realizado mediante GC-FID de la cinética de caramelización mostró variaciones en el contenido total y en las proporciones relativas de los glucodisacáridos (Figuras 4.16., 4.17. y 4.18.). En los dos casos, la conversión fue mucho más lenta que la caramelización catalizada con sílica $H_2SO_4 \cdot SiO_2$.

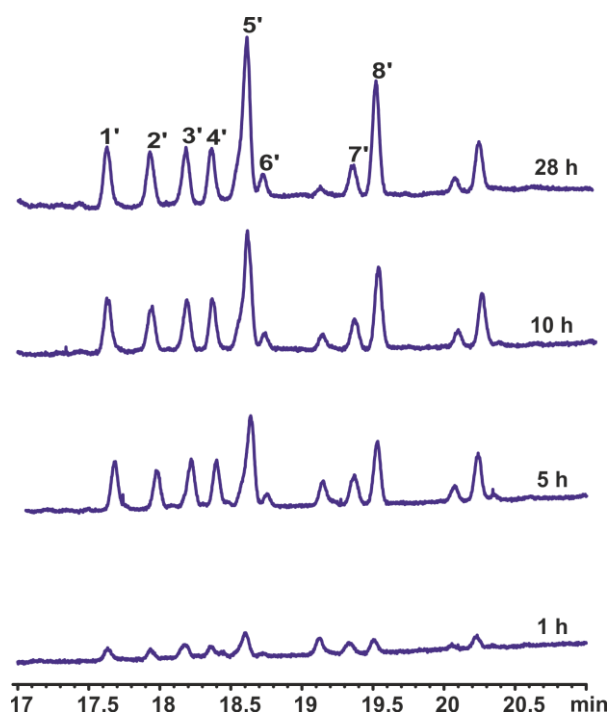


Figura 4.16. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-glucosa (83%) a 90 °C en presencia sílica ácida SAF (20%). Región de disacáridos de D-glucosa a 1, 5, 10 y 28 h.

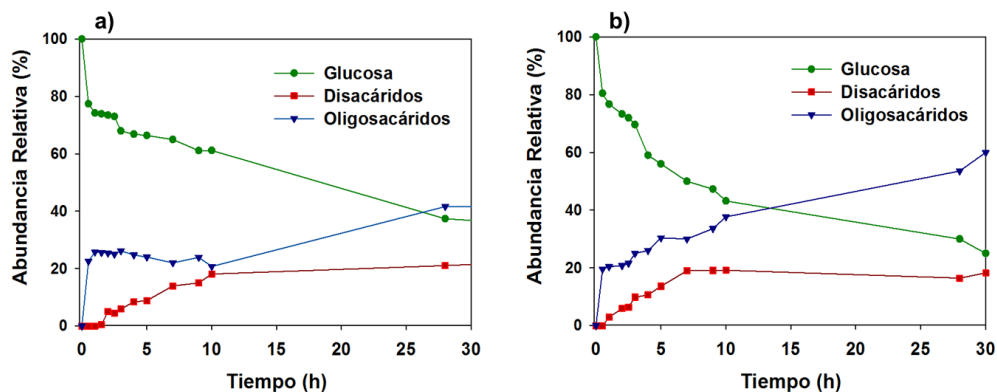


Figura 4.17. Variaciones de las proporciones relativas de D-glucosa, disacáridos y oligosacáridos superiores durante la caramelización de D-glucosa (80%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) (a) y (20%) (b).

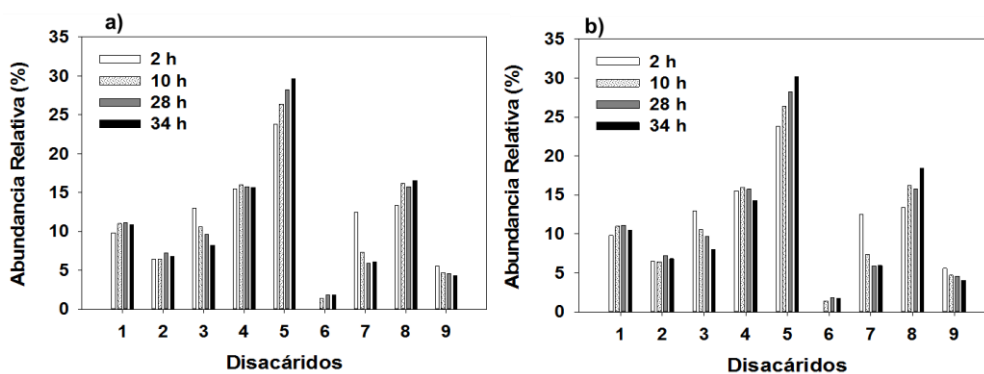


Figura 4.18. Variaciones de las proporciones relativas de los glucodisacáridos durante la caramelización de D-glucosa (80%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) (a) y (20%) (b).

4.3. Caramelización de D-manosa empleando resina ácida y sílicas modificadas

Los manooligosacáridos (MOS) son oligosacáridos no digeribles que se comportan como fibra dietética y como prebióticos. Tienen efectos beneficiosos sobre el crecimiento

de microorganismos intestinales, especialmente de las *Bifidobacteria*, pueden disminuir las bacterias patógenas entéricas, regular las inmunoreacciones y mejorar la integridad de la mucosa, aumentando así el nivel de salud humana. Los polisacáridos de manosa (mananos), por su parte, son biopolímeros complejos que se encuentran comúnmente en la pared de las células vegetales, asociados con la celulosa y la lignina, y tienen diversas aplicaciones. Por ejemplo, se usan como ingredientes incorporados en piensos para animales, como aditivos en la alimentación de peces, en sistemas de purificación y tratamientos de agua, y en algunos fármacos. La harina de konjac, cuyo componente fundamental es un glucomanano, se ha utilizado en Asia durante siglos como agente espesante, gelificante y como ingrediente para alimentos. Se cree que estos polímeros atraviesan el tracto gastrointestinal superior sin digerir, y que cierta cantidad se hidroliza por las bacterias en el colon. Zhang y col. utilizaron la harina konjac como sustrato para el *Bacillus sp. MAN-5*, generando así manooligosacáridos de alto valor añadido.¹⁻²

Asano y col., obtuvieron una mezcla de manooligosacáridos por hidrólisis de los granos de café molido, de la que aislaron fracciones de β -1,4-D-manobiosa, β -1,4-D-manotriosa, β -1,4-D-manotetraosa y β -1,4-D-manopentosa. Todos los manooligosacáridos fueron utilizados por *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus gasseri*, mientras que las bacterias potencialmente dañinas, como *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli*, que producen sustancias mutagénicas, no pudieron usarlos. De estos resultados puede concluirse que los MOS tienen potencial para promover una microflora intestinal humana saludable, actuando como prebióticos.³ Los estudios clínicos mostraron además que el consumo de MOS extraídos del café disminuyen la grasa corporal, son útiles para el control del peso y para el balance energético.⁴

Otro tipo de MOS son los manooligosacáridos complejos de las glicoproteínas presentes en la pared celular de la levadura del pan (*Saccharomyces cerevisiae*). Consisten

en una cadena principal de manosas unidas mediante enlaces α -1,6 con ramificaciones de tipo α -1,2 y α -1,3.⁵⁻⁶ Estos MOS también se utilizan en la elaboración de alimentos, en particular en la cerveza y el pan.

Existen estudios en el área de la acuicultura acerca del uso de los MOS como inmunoestimulantes.⁷ Los MOS que se encuentran en muchas plantas (café, frijoles, etc.)⁸ pueden usarse como aditivos naturales para bloquear la adhesión bacteriana y prevenir la contaminación por *Salmonella typhimurium* en el intestino de pollos de engorde.⁹ El uso de enzimas manasas termoestables representa una alternativa interesante para la producción de manooligosacáridos con propiedades prebióticas potenciales a partir de mananos. Los MOS obtenidos mediante estos métodos biotecnológicos favorecieron el crecimiento de *Lactobacillus Casei* e inhibieron el crecimiento de *Salmonella entérica*.¹⁰⁻

11

En el marco de esta Tesis nos hemos propuesto investigar el uso de catalizadores ácidos heterogéneos como catalizadores para preparar caramelos de manosa enriquecidos en manooligosacáridos no digeribles, que serían análogos a los MOS obtenidos a partir de mananos por métodos biotecnológicos, cuyas aplicaciones en la industria alimentaria se han comentado. Aunque las rutas biotecnológicas son más selectivas y, generalmente, preferibles para la obtención de oligosacáridos y polisacáridos, el aislamiento del producto final y el reciclado de las enzimas y de los efluentes que se generan plantean en muchos casos problemas cuya solución no es trivial. De hecho, la polimerización de carbohidratos sigue siendo hoy en día una reacción para la que existe una demanda alta de tecnologías innovadoras. En los subapartados siguientes se discute el uso de la resina ácida de intercambio iónico Lewatit[®] S2328 (H^+) y el uso de la sílica ácida ($H_2SO_4 \cdot SiO_2$ y $H_3PO_4 \cdot SiO_2$), como catalizadores para las reacciones con este fin.

Dado que las ocho manobiosas dipiranosídicas con uniones α o $\beta(1,n)$, con $n = 2, 3, 4$ o 6 , son comercialmente asequibles, hemos establecido previamente los tiempos de retención y los correspondientes factores de respuesta (K_r) para todas, así como para la D-manosa, utilizando patrones puros a diferentes concentraciones (ver Parte Experimental). Adicionalmente, hemos incluido en nuestro estudio un patrón de manotriosa con uniones $\alpha(1\rightarrow6)$. Las estructuras de todos los patrones di y trisacáridicos están recogidas en la Figura 4.20.

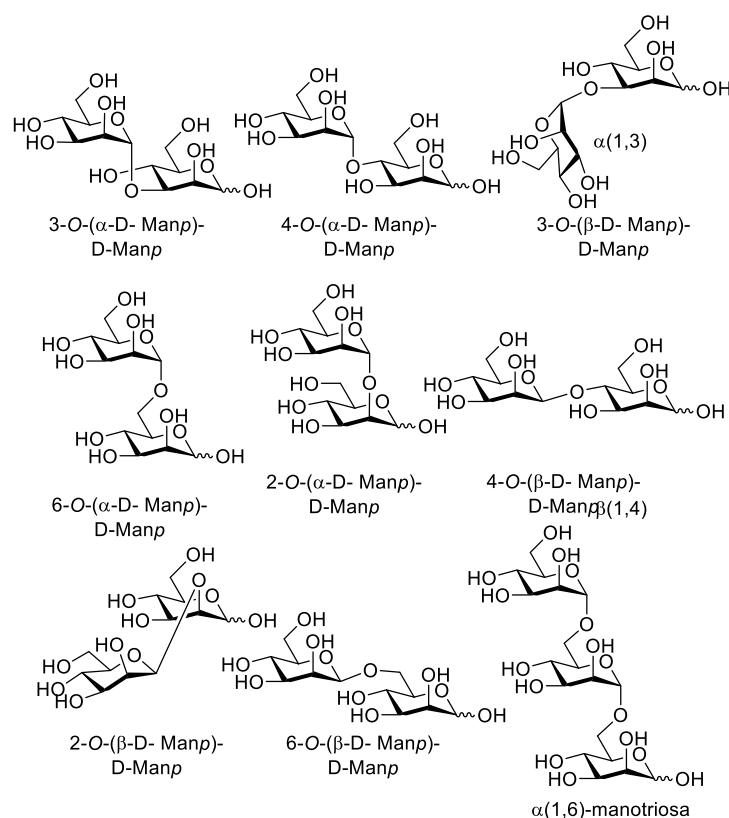


Figura 4.19. Estructura de los patrones di- y trisacáridicos de manosa utilizados en este estudio.

4.3.1. Reacciones de caramelización de D-manosa con resina Lewatit® S2328 (H^+)

Para el estudio de la cinética de caramelización de la D-manosa promovida por la resina de intercambio iónico Lewatit® S-2328 (H^+) se utilizaron disoluciones de D-manosa al 80% y 90% (p/v) en agua desionizada. En ambos casos se utilizó un 10% del catalizador y una temperatura de reacción de 90 °C, y se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo para su análisis por GC-FID. En los cromatogramas de las muestras de caramelos se identificaron picos correspondientes a las manobiosas y manotriosas para las que se disponía de patrones puros. En todos los casos los disacáridos con uniones (1→6) son los compuestos mayoritarios, pero la proporción entre los anómeros α y β depende significativamente del tiempo de reacción (Figura 4.21). A tiempos de reacción cortos, el diastereoisómero $\beta(1\rightarrow6)$ es el producto mayoritario, mientras que a tiempos más largos lo es el diastereoisómero $\alpha(1\rightarrow6)$. Este resultado es similar al que se obtenía en el caso del caramelo preparado a partir de la D-glucosa.

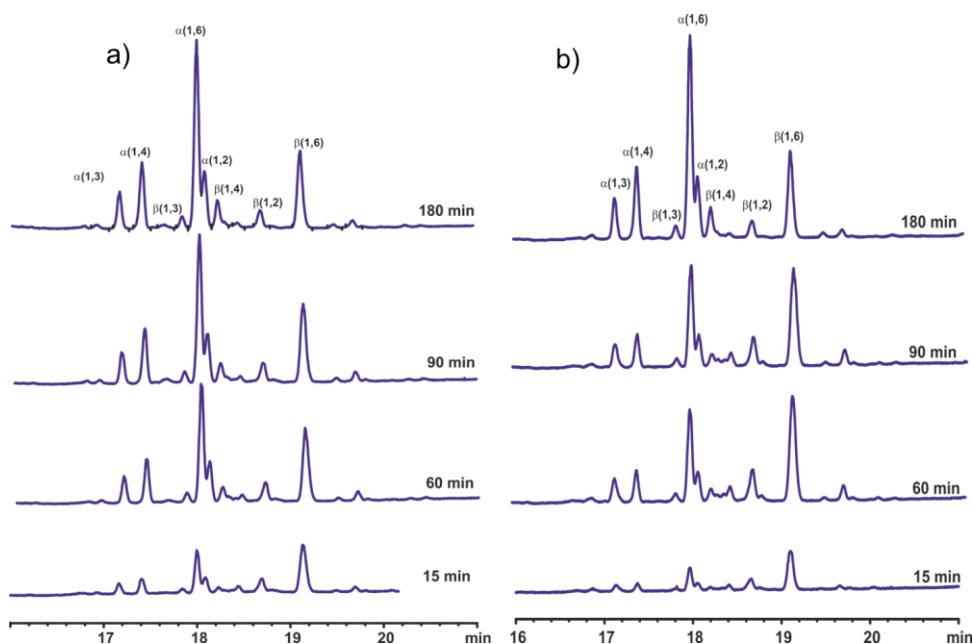


Figura 4.20. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia resina Lewatit® S2328 (H^+) (10%). Región de disacáridos de D-manosa a 15, 60, 90 y 180 min.

La concentración inicial de manosa tiene un efecto notable en la velocidad de isomerización de los compuestos de control cinético, especialmente el disacárido $\beta(1\rightarrow6)$, en los de control termodinámico, como el disacárido $\alpha(1\rightarrow6)$. Cuando se emplea una concentración de D-manosa del 80% el disacárido $\alpha(1\rightarrow6)$ es el disacárido mayoritario a los 30 min (Figura 4.21a). En cambio, al aumentar la concentración de D-manosa al 90% esto no ocurre hasta los 150 min (Figura 4.21b). Probablemente, la formación de los disacáridos $(1\rightarrow6)$ está favorecida estéricamente dada la mayor accesibilidad del hidroxilo primario. Las posteriores reacciones de isomerización requieren la hidrólisis de las uniones glicosídicas inicialmente formadas, una reacción que está favorecida cuando la proporción de agua es mayor.

La velocidad de conversión de la D-manosa en derivados oligosacáridicos es algo más rápida cuando se utiliza una concentración del 80% debido a que, aunque la reacción de reversión está favorecida a concentraciones elevadas, el aumento de la viscosidad dificulta la mezcla con el catalizador heterogéneo (Figura 4.22.). Los espectros de masas EM-MALDI muestran además la presencia de oligosacáridos de peso molecular creciente. El grado de polimerización (DP) aumenta con el tiempo de reacción, detectándose oligómeros de hasta DP 17 y 13 para las reacciones de caramelización con un 80% y 90% de D-manosa, tras 105 min (Figuras 4.23.). La fracción disacáridica supone aproximadamente el 32% y 34%, respectivamente, de los oligosacáridos de reversión que se forman. Las variaciones en las proporciones relativas de los diferentes isómeros en función del tiempo se recogen en la Figura 4.24.

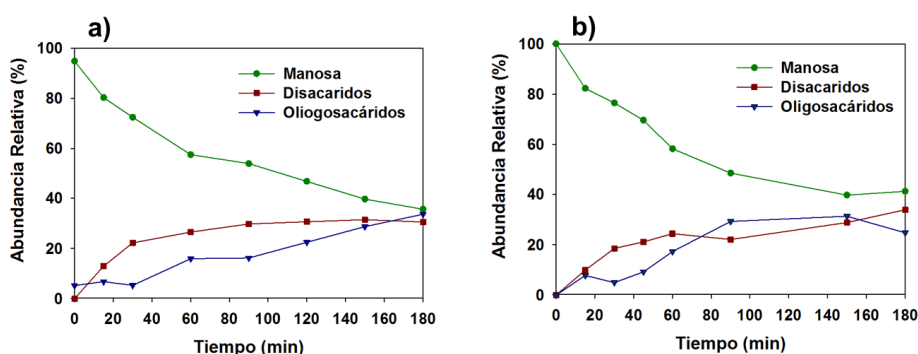


Figura 4.21. Variaciones de las proporciones relativas de D- manosa, disacáridos de manosa y oligosacaridos superiores durante la caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C empleando resina ácida Lewatit S2328 (H^+) (10%) durante 180 min.

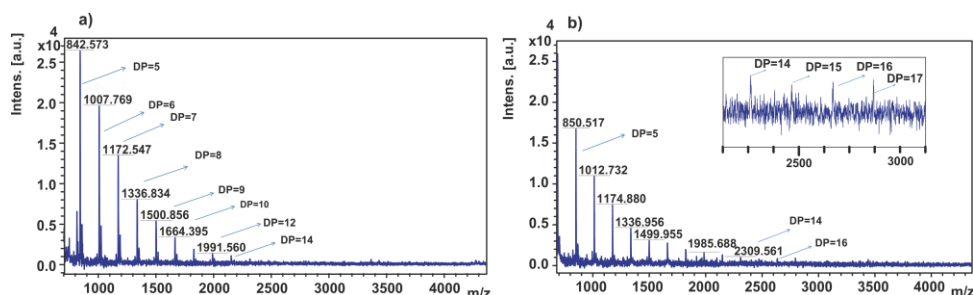


Figura 4.22. Espectros de masas en modo MALDI del caramelo obtenido a partir de D-manosa (90%) a 90 °C en presencia de resina ácida Lewatit S2328 (H^+) (10%) tras 15 min (a) y 105 min (b).

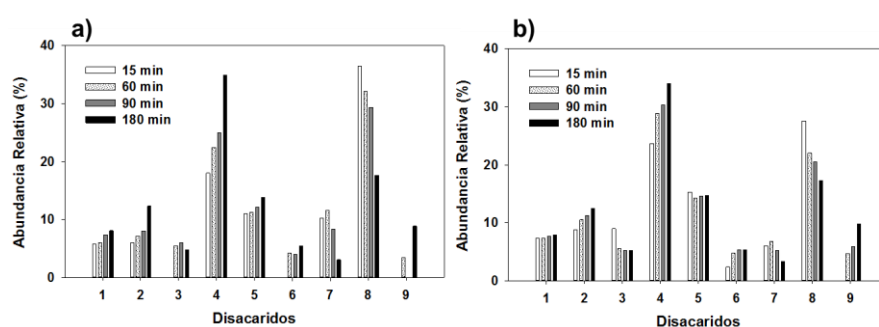


Figura 4.23. Variaciones de las proporciones relativas de disacáridos de D-manosa durante la caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia de resina ácida Lewatit S2328 (H^+) (10%).

4.3.2. Reacciones de caramelización de D-manosa con H_2SO_4 SiO_2 (SAS)

Para determinar la influencia de la concentración de D-manosa inicial en el resultado de la reacción promovida por la silica ácida SAS, se realizaron experimentos utilizando disoluciones concentradas del monosacárido en agua deionizada (80% y 90% p/v), con una proporción de 10% del catalizador, a 90 °C. En ambos casos se tomaron alícuotas de reacción a diferentes intervalos de tiempo para su análisis mediante cromatografía de gases, tras oximación-acetilación de las muestras. En los cromatogramas correspondientes

se identificaron picos para las manobiosas y manotriosas. En todos los casos los disacáridos con uniones (1→6) son los compuestos mayoritarios (Figura 4.25.). A diferencia de lo observado para el caso de la resina Lewatit® S2328 (H⁺), el diastereoisómero $\alpha(1\rightarrow6)$ es el producto mayoritario incluso a tiempos de reacción cortos (15 min), seguido del diastereoisómero $\beta(1\rightarrow6)$ y el $\alpha(1\rightarrow4)$.

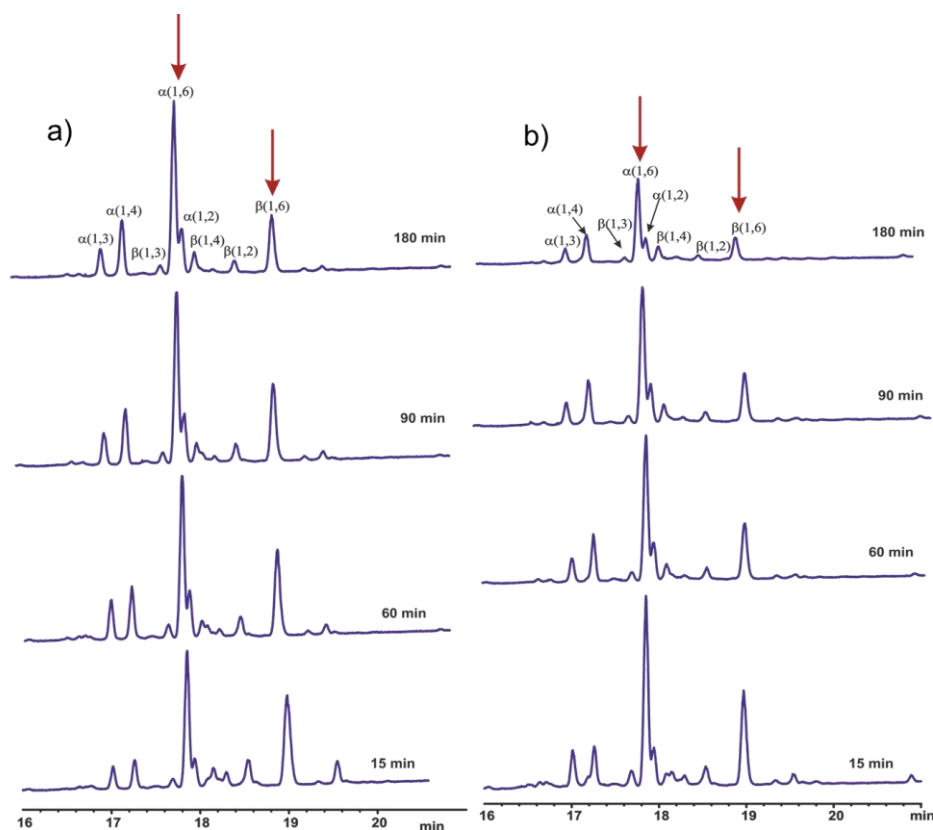


Figura 4.24. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia sílica ácida SAS (10%). Región de disacáridos de D-manosa a 15, 60, 90 y 180 min.

Cuando se usó una concentración inicial del monosacárido del 90%, se alcanzaron conversiones de D-manosa en oligosacáridos de reversión más altas que cuando se partió

de una concentración inicial del 80% (Figura 4.26). El grado de polimerización (DP) aumenta con el tiempo de reacción, detectándose oligómeros de hasta DP 20 y 13 para las reacciones de caramelización con un 90% de D-manosa, tras 15 y 240 min (Figuras 4.27).

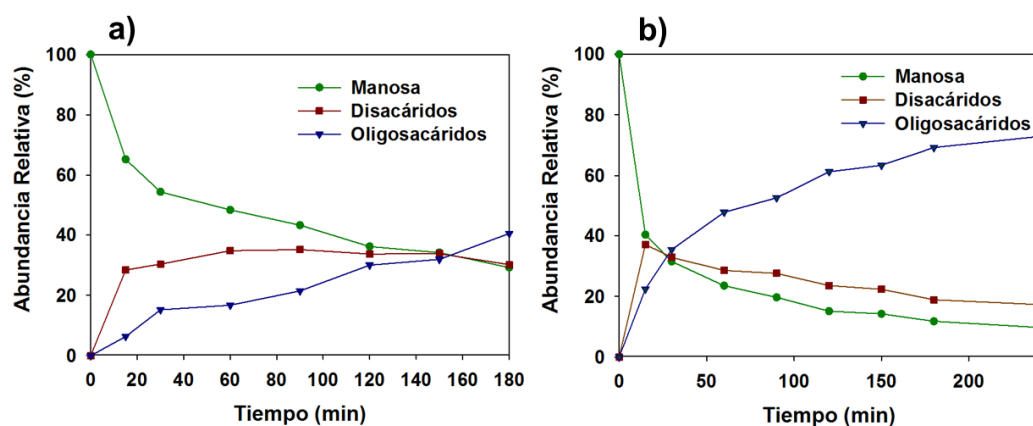


Figura 4.25. Variaciones de las proporciones relativas de D-manosa, disacáridos de manosa y oligosacáridos superiores durante la caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%).

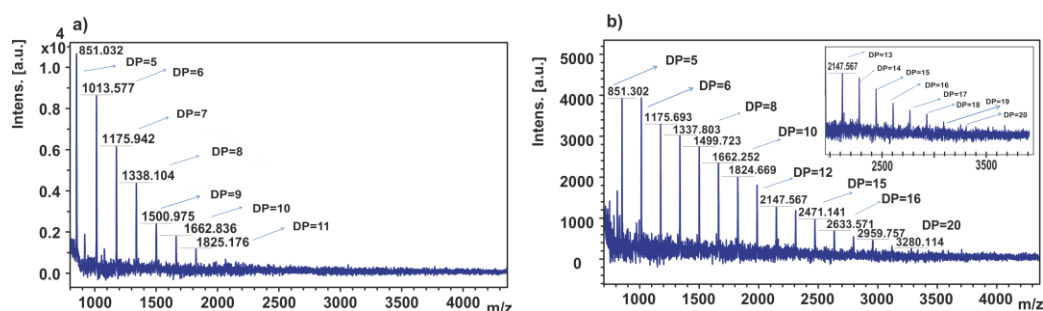


Figura 4.26. Espectros de masas en modo MALDI del caramelo obtenido a partir de D-manosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%) tras 15 min (a) y 240 min (b).

En la **Figura 4.28**. Se indican las proporciones relativas de los diferentes isómeros manodisacáridicos presentes en el caramelo de manosa en función del tiempo, siendo los disacárido 4 y 8, con uniones $\alpha(1,6)$ y $\beta(1,6)$, los compuestos mayoritarios. La tendencia es similar a la observada para la caramelización con la resina Lewatit[®] S2328, pero con la sílica SAS la proporción del derivado **8** disminuye más rápidamente con el tiempo.

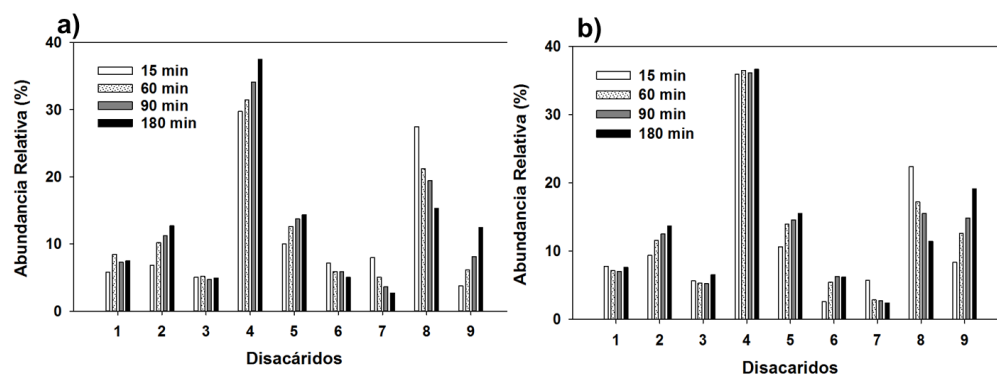


Figura 4.27. Variaciones de las proporciones relativas de disacáridos de D-manosa durante la caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAS (10%).

4.3.3. Reacciones de caramelización de D-manosa con $H_3PO_4 \cdot SiO_2$ (SAF)

Para estudiar la eficacia de la sílica ácida $H_3PO_4 \cdot SiO_2$ (SAF) como catalizador de la reacción de caramelización de la D-manosa, se ha llevado a cabo un estudio cinético similar al descrito en el apartado anterior. En concreto se han empleado dos concentraciones iniciales del azúcar (80% y 90% p/v) con un 10% de catalizador a 90°C. De manera general, en comparación con la SAS, en este estudio se observa que la formación de oligosacáridos de reversión es más lenta, como ya ocurría para la D-fructosa y la D-glucosa. Los disacáridos con uniones (1→6) son los compuestos predominantes en el producto resultante. A tiempos de reacción cortos, el diastereoisómero $\beta(1\rightarrow6)$ es el

producto mayoritario seguido del $\alpha(1\rightarrow6)$, un perfil que es diferente al encontrado para caramelizacio catalizada por la sílica SAS (Figura 4.29).

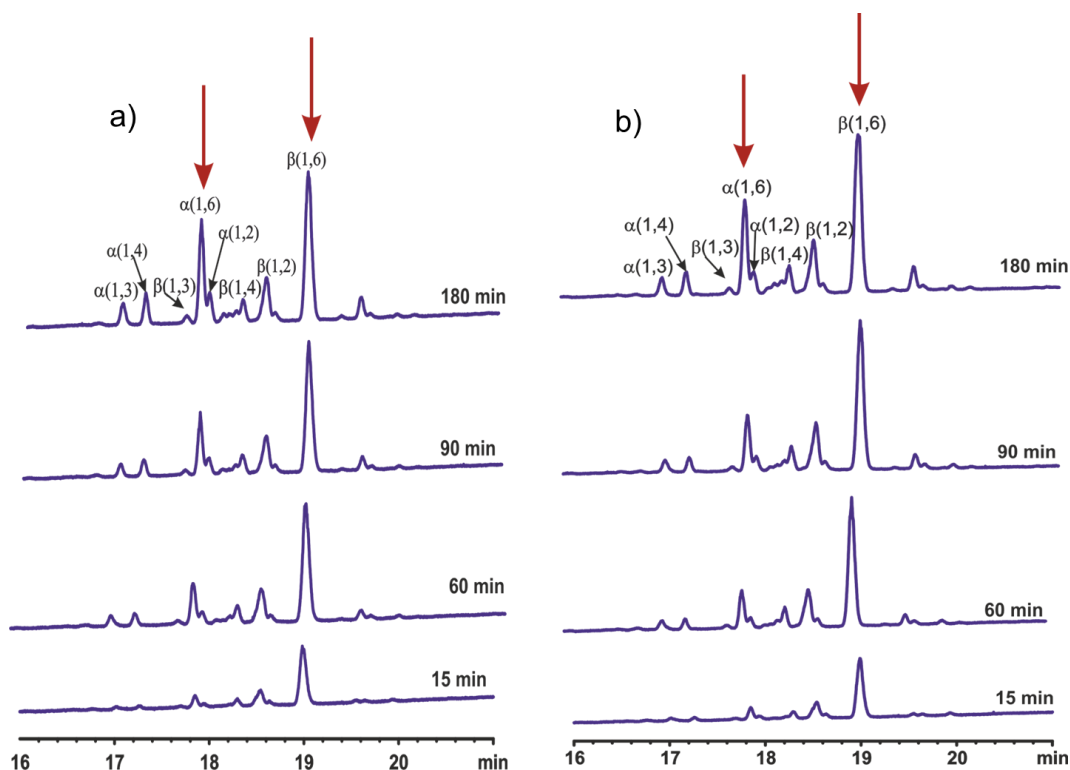


Figura 4.28. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia sílica ácida SAF (10%). Región de disacáridos de D-manosa a 15, 60, 90 y 180 min.

Como cabía de esperar, dada la menor actividad del catalizador SAF, las conversiones que se alcanzan son relativamente bajas, entre el 30% y el 40% tras 10 h (Figura 4.30). Los espectros de EM-MALDI indican la formación de oligosacáridos de peso molecular creciente cuya proporción aumenta con la contracción de manosa inicial y con el tiempo de reacción. Cuando se parte de una disolución al 90% de manosa con un 10% de SAF, tras 240 min a 90 °C se detectan oligosacáridos de hasta DP 9 (Figura 4.31).

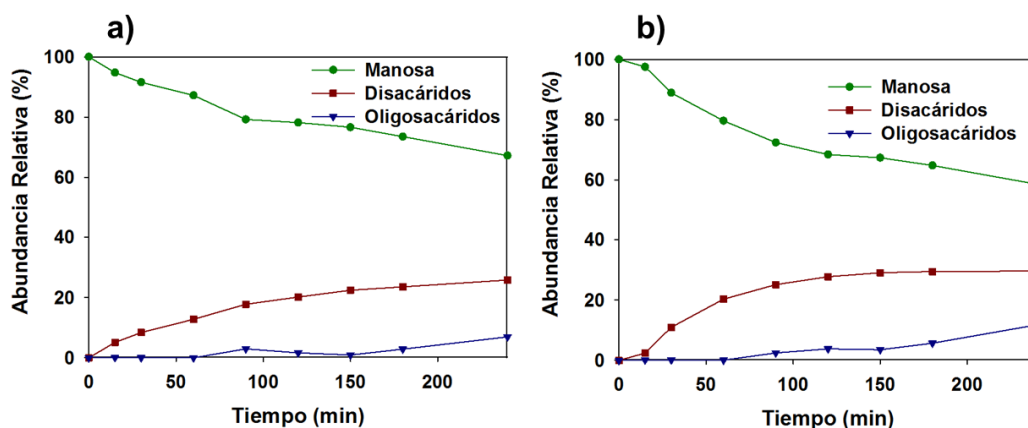


Figura 4.29. Variaciones de las proporciones relativas de D-manosa, disacáridos de manosa y oligosacáridos superiores durante la caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%).

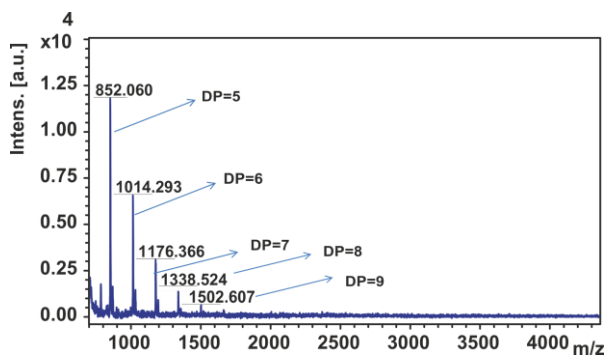


Figura 4.30. Espectros de masas en modo MALDI del caramelo obtenido a partir de una disolución de D-manosa (90%) a 90 °C en presencia de sílica ácida SAF (10%) tras 180 min.

Las proporciones relativas de los diferentes manodisacáridos isoméricos a diferentes tiempos, obtenidos de los correspondientes perfiles cromatográficos, se muestran en la Figura 4.32.

El diastereoisómero $\beta(1\rightarrow6)$ es el compuesto mayoritario en todos los casos. Este resultado es significativamente diferente a lo observado para la caramelización de la manosa promovida por la resina Lewatit[®] S2328 (H^+) o por la sílica ácida SAS, en la que había una preferencia por el isómero $\alpha(1\rightarrow6)$. Como ya se discutió para los casos de Palatinosa[®], fructosa y glucosa, la sílica ácida SAF, al ser menos activa, conduce a distribuciones cinéticas de compuestos, en tanto que la resina SAS favorece distribuciones termodinámicas.

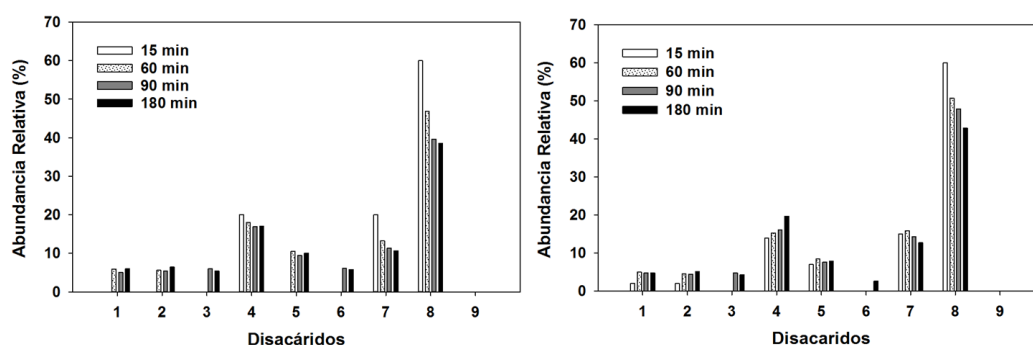


Figura 4.31. Variaciones de las proporciones relativas de disacáridos de D-manosa durante la caramelización de D-manosa (80%) (a) y (90%) (b) a 90 °C en sílica ácida SAF (10%).

Los resultados comentados en este capítulo confirman, por tanto, la posibilidad de utilizar sílicas modificadas con los ácidos sulfúrico o fosfórico para promover la caramelización de azúcares, favoreciendo la formación de DAFs y glicosil-DAFs en el caso de la fructosa y de oligosacáridos de reversión en el caso de aldosas como la glucosa o la manosa. Para este último azúcar se ha comprobado también que la resina de intercambio iónico Lewatiti[®] S2328 (H^+) es útil para llevar a cabo la transformación. En conjunto, las metodologías desarrolladas permiten modular la composición de los caramelos, variando las proporciones de los oligosacáridos presentes, lo que debe permitir optimizar sus propiedades para aplicaciones concretas. En este sentido, cabe destacar que

de manera paralela a esta Tesis se ha desarrollado una metodología que utiliza plasma frío no atmosférico, consistente en un gas ionizado obtenido aplicando una diferencia de potencial elevada entre dos electrodos separados por un dieléctrico, que también permite llevar a cabo la oligomezación de azúcares, incluida la D-manosa, con formación de MOS.¹²

Bibliografía

1. Chauhan, P. S.; Puri, N.; Sharma, P.; Gupta, N., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2012**, 93, 1817-1830.
2. Zhang, M.; Chen, X. L.; Zhang, Z. H.; Sun, C. Y.; Chen, L. L.; He, H. L.; Zhou, B. C.; Zhang, Y. Z., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2009**, 83, 865-873.
3. Asano, I.; Nakamura, Y.; Hoshino, H.; Aoki, K.; Fujii, S.; Imura, N.; Iino, H., *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*, **2001**, 75, 1077-1083.
4. Salinardi, T. C.; Rubin, K. H.; Black, R. M.; St-Onge, M. P., *J. Nutr.*, **2010**, 140, 1943-1948.
5. Mansour, M. K.; Levitz, S. M., *ASM News* **2003**, 69, 595-600.
6. Vinogradov, E.; Petersen, B.; Bock, k., *Carbohydr. Res.*, **1998**, 307, 177-183.
7. Song, S. K.; Beck, B. R.; Kim, D.; Park, J.; Kim, J.; Kim, H. D.; Ringø, E., *Fish & Shellfish Immunology*, **2014**, 40, 40-48.
8. Smith, D. L.; Nagy, T. R.; Wilson, L. S.; Dong, S.; Barnes, S.; Allison, D. B., *Obesity (Silver Spring, Md.)*, **2010**, 18, 995-999.
9. Oyofa, B. A.; Deloach, J. R.; Corrier, D. E.; Norman, J. O.; Ziprin, R. L.; Mollenhauer, H. H., *Poultry Sci.*, **1989**, 68, 1357-1360.
10. Chauhan, P. S.; Sharma, P.; Puri, N.; Gupta, N., *Eur. Food Res. Technol.*, **2014**, 238, 927-936.
11. Zang, H.; Xie, S.; Wu, H.; Wang, W.; Shao, X.; Wu, L.; Rajer, F. U.; Gao, X., *Enzyme Microb. Tech.*, **2015**, 78, 1-9.
12. Delaux, J.; Nigen, M.; Fourre, E.; Tatibouet, J. M.; Barakat, A.; Atencio, L.; Garcia Fernández, J. M.; De Oliveira Vigier, K.; Jerome, F., *Green Chem.*, **2016**, 18, 3013-3019.

5, PREPARACIÓN DE CAMELOS PREBIÓTICOS A PARTIR
DE D-FRUCTOSA Y PALATINOSA[®] UTILIZANDO CO₂ COMO
CATALIZADOR



5. Preparación de caramelos prebióticos a partir de D-fructosa y Palatinosa® utilizando CO₂ como catalizador

El creciente interés en las propiedades prebióticas de los DAFs ha estimulado la búsqueda de nuevas metodologías para su preparación que sean susceptibles de desarrollo industrial. Los métodos basados en el uso de catalizadores ácidos heterogéneos (resinas, sílicas, etc.), como los comentados en los apartados anteriores de esta Tesis, son prometedores, pero su escalado requiere resolver los problemas técnicos derivados de la elevada viscosidad del medio de reacción y la necesidad de separar el catalizador al final del proceso. Las mayores conversiones en DAFs y glicosil-DAFs descritas en la bibliografía se obtuvieron por activación de la inulina, la fructosa o las glicosilfructosas con fluoruro de hidrógeno anhidro (HF) o con reactivos derivados del HF.¹⁻⁶ Sin embargo, la implementación de este procedimiento a escala industrial es complicada debido al riesgo para la salud que suponen las trazas de sales de fluoruro en el producto final. Alternativamente se han desarrollado métodos enzimáticos que, partiendo de fructanos, permiten acceder a diastereómeros de DAFs puros.⁷⁻¹⁰ Más recientemente, se ha descrito una síntesis del 1,2':2,3'-dianhidrido de α -D-fructofuranosa β -D-fructofuranosa mediante el empleo conjunto de una sacarosa fructosiltransferasa y una inulina fructotransferasa¹¹. El principal inconveniente de estas síntesis biotecnológicas es la baja estabilidad térmica y dependencia del sustrato de las enzimas utilizadas y el alto coste que conllevan.

A la vista de estos antecedentes, en este capítulo se describen los resultados acerca de la transformación de azúcares alimentarios en caramelos enriquecidos en oligosacáridos con actividad prebiótica mediante el uso de dióxido de carbono (CO₂) como catalizador o el uso conjunto de CO₂ y un ácido alimentario, como los ácidos acético, fosfórico o cítrico, bajo condiciones de reacción homogéneas. El ácido carbónico formado a partir de CO₂ y agua se ha utilizado de hecho con éxito como catalizador en varias reacciones orgánicas¹²⁻¹⁴. Una ventaja importante del método es que hace innecesaria la separación del catalizador al final del proceso ya que no genera ningún residuo. Los caramelos

preparados a partir de esta tecnología presentan composiciones análogas a los que se obtienen con catalizadores heterogéneos como la resina Lewatit® S2328 (H⁺). Por tanto, cabe esperar que de modo análogo presenten propiedades beneficiosas para la salud tanto en animales como en humanos, particularmente para el tratamiento y la prevención de patologías que afectan al aparato digestivo como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el cáncer de colon o enfermedades infecciosas como las provocadas por *E.coli* o *Salmonella*. También podrían utilizarse en la preparación de nutracéuticos específicos para la prevención y tratamiento de estas patologías.

5.1. Caramelización de la D-Fructosa promovida por CO₂.

En primer lugar se llevó a cabo un estudio de la composición de los caramelos preparados a partir de D-fructosa utilizando exclusivamente CO₂ como promotor de la caramelización. En la Parte Experimental y en la Tabla 7.4. se recogen las diferentes condiciones de reacción empleadas. En todos los casos se tomaron alícuotas de la reacción para su análisis mediante cromatografía de gases, tras oximación-trimetilsililación de las muestras.

Para estudiar la cinética de caramelización de la D-fructosa se utilizó una disolución al 85% (peso/volumen) de D-fructosa en agua que se introdujo en un reactor de acero inoxidable y se inyectó CO₂ hasta alcanzar una presión de 20 bares. Tras calentamiento a 90 °C durante 2, 10, 24 y 72 h, el análisis por cromatografía de gases mostró la formación de DAFs con una proporción que alcanza un 43% al cabo de 72 h. Los isómeros mayoritarios fueron los DAFs **9** (αfβp) y **10** (αfβf) (Figura 5.1). A medida que avanza la reacción se observa la isomerización del segundo, que es el producto de control cinético, para dar el primero, más estable termodinámicamente. La conversión máxima de D-fructosa alcanzada al cabo de 72 h fue aproximadamente del 61%

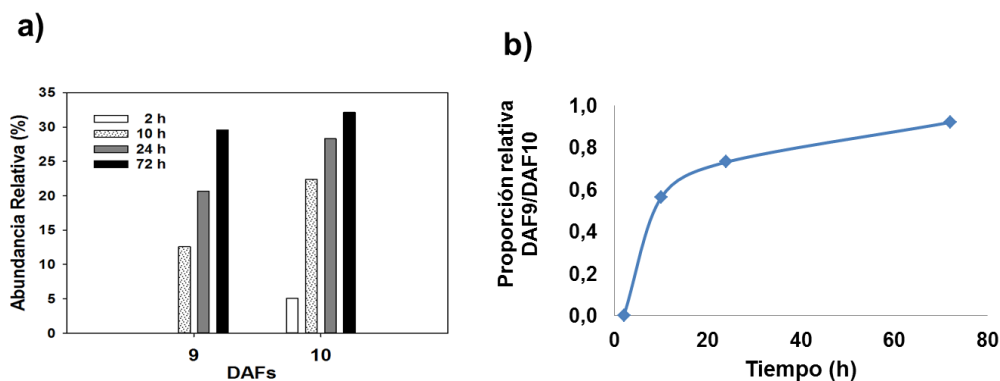


Figura 5.1. Abundancia relativa (a) y variación de la proporción relativa (b) de los dianhidridos de di- D-fructosa DAF **9** y DAF **10** durante la caramelización de D-fructosa (85%) a 90 °C empleando CO₂ (20 bares).

Un experimento análogo (D-fructosa al 85%, 90 °C y 72 h) pero utilizando una presión de CO₂ de 1.2 bares, mostró un resultado prácticamente idéntico (conversión de fructosa 63% frente 61%). La proporción de DAFs en el caramelo final supone el 45%. Además, se observa la presencia de fructooligosacáridos superiores con DP 3-10 (16%). El resto del caramelo (2%) está constituido esencialmente por 2-hidroximetilfurfural (HMF) y melanoidinas. La única diferencia observada en la preparación de los caramelos usando 20 y 1.2 bares de presión de CO₂ es una isomerización algo más lenta del DAF **9** en el DAF **10**. (Figura 5.2)

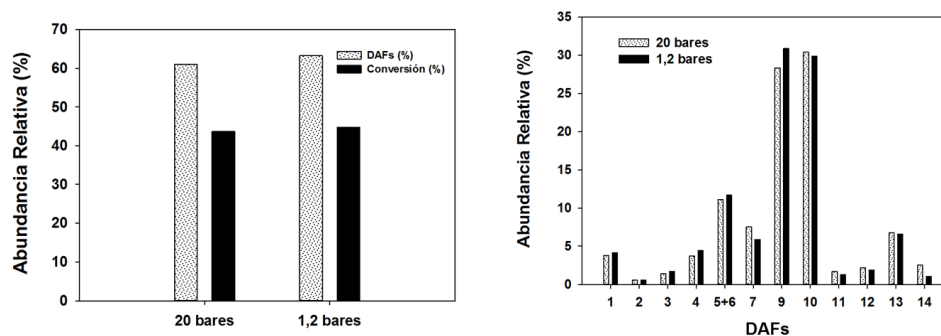


Figura 5.2. Conversión y proporciones relativas de los diferentes dianhidridos de di-D-fructosa durante la caramelización de la D-fructosa (85%) a 90 °C empleando CO₂ (20 y 1,2 bares) tras 72 h.

En un tercer ensayo se partió de una disolución de D-fructosa en agua al 85% (peso/volumen) y se empleó CO₂ a una presión de 20 bares a 100 °C durante 48 h. El análisis por cromatografía de gases indicó una conversión de la D-fructosa del 72%, con una formación de DAFs en una proporción del 47%. Los DAFs **9** y **10** continúan siendo los compuestos mayoritarios. Los fructooligosacáridos superiores de DP 3-12, esencialmente fructosil-DAFs, suponen un 22%. El resto (3%) está constituido esencialmente por 2-hidroximetilfurfural (HMF) y melanoidinas (Figura 5.3a). El incremento de la temperatura, de 90 a 100 °C, aumenta por tanto la velocidad de conversión de la fructosa y promueve un aumento de la proporción de fructosil-DAFs. La distribución relativa de los diferentes dianhidridos de di-D-fructosa, determinadas a partir del correspondiente cromatograma de gases, se recoge en la Figura 5.3b. Ensayos análogos pero empleando una mayor escala (en los experimentos iniciales se parte de 30 g de fructosa y en este caso se partió de 180 g; ver parte experimental) permitieron obtener una conversión de fructosa del 69% y una fracción de DAFs de un 40%. El aumento de escala afectó por tanto la composición final del caramelo, aunque no de manera significativa (Figura 5.4).

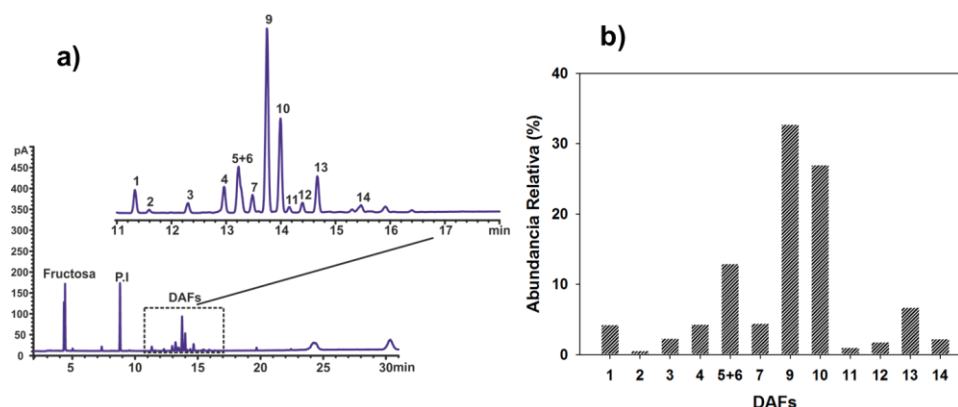


Figura 5.3. Cromatograma GC-FID del caramelo de D-fructosa (85%) a 100 °C, empleando CO₂ (20 bares) durante 48 h (a) y variación de las proporciones relativas de los diferentes dianhidridos de di-D-fructosa (b).

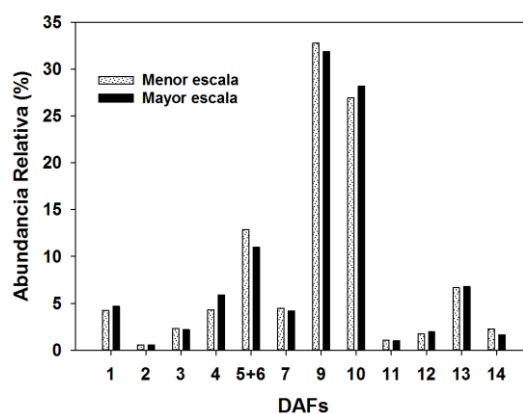


Figura 5.4. Variaciones de las proporciones relativas de dianhidridos di-D-fructosa durante la caramelización de D-fructosa (85%) a 100 °C empleando CO₂ (20 bares) a diferentes escalas durante 48 h..

El espectro de masas en modo ESI del caramelo, registrado en modo negativo, muestra la presencia de oligosacáridos de DP 3-12, con picos pseudomoleculares compatibles con una estructura de dianhidridos de fructosa fructosilados (Figura 5.5).

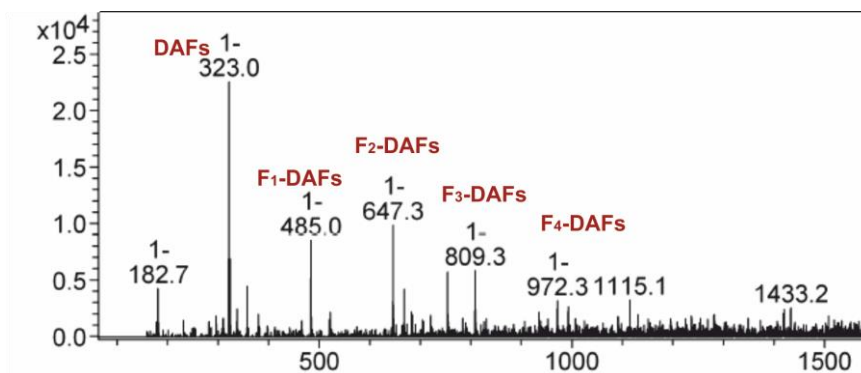


Figura 5.5. Espectro de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de D-fructosa (85%) a 100°C empleando CO₂ (20 bares) durante 48 h.

Con objeto de determinar la influencia del CO₂ como catalizador, se llevó a cabo un experimento control partiendo de una disolución de D-fructosa al 85% (peso/volumen) a 100 °C a la que se inyectó N₂ en lugar de CO₂ durante 48 h. En este caso se obtuvo una conversión de fructosa menor (64% en lugar de 72%). Es interesante destacar que la proporción de DAFs en el caramelo final fue mayor cuando la reacción se realizó en atmosfera de N₂, alcanzando un 54% frente a un 47%(Figura 5.6.). Los datos apuntan a que el CO₂ acelera especialmente la formación de fructosil-DAFs, lo que conduce a mayores conversiones de fructosa.

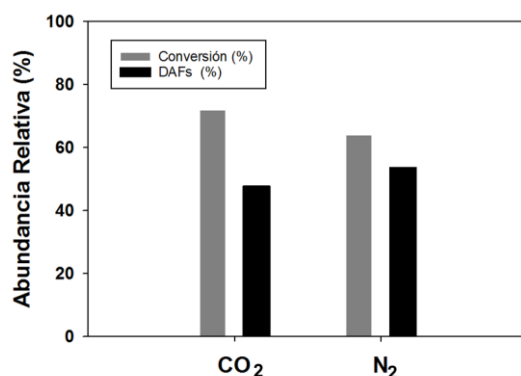


Figura 5.6. Variación de la conversión y proporciones relativas de los dianhidridos de di-D-fructosa durante la caramelización de la D-fructosa (85%) a 100 °C empleando CO₂ y N₂ durante 48 h.

En otra serie de experimentos se analizó la influencia del uso combinado de CO₂ y ácido cítrico como promotores de la caramelización. Para ello se partió de disoluciones al 85% (peso/volumen) de D-fructosa con un 5% o 10% (peso/peso) de ácido cítrico relativo a la fructosa de partida, y se inyectó CO₂ hasta alcanzar una presión de 20 bares. La mezcla de reacción se homogenizó y se calentó a 90 °C durante 12 horas. En el primer caso la conversión de la fructosa fue de un 62%, mientras que en el segundo caso la conversión aumentó, alcanzando un 69%. La proporción de DAFs en el producto final fue del 50% y 53%, respectivamente (Tabla 5.1 y Figura 5.7.).

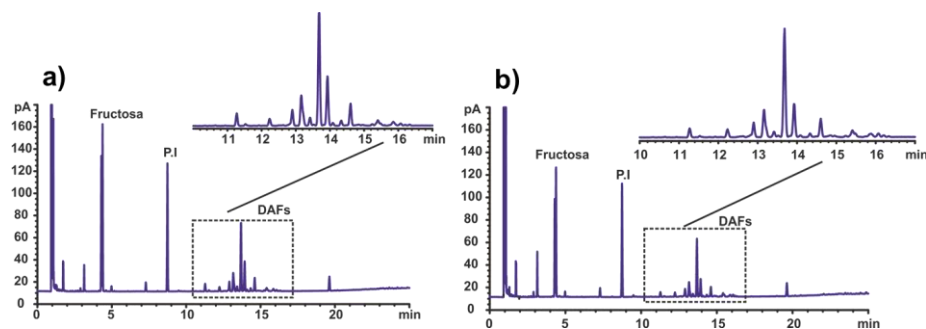


Figura 5.7. Cromatogramas GC-FID) del caramelo de fructosa (85%) a 90 °C empleando CO₂ (20 bares) y ácido cítrico (5%) (a) y (10%) (b) durante 12h.

Tabla 5.1. Composición final del producto obtenido por la reacción de caramelización, empleando D-fructosa (85% p/v), en combinación con ácido cítrico y CO₂ (20 bar).

	Ácido cítrico 5%	Ácido cítrico 10%
Fructosa	40	34
DAFs	50	53
Glicosil-DAFs	9	11
HMF	1	2

Las proporciones relativas de los diferentes dianhidridos de di-D-fructosa, determinadas a partir del correspondiente cromatograma de gases, se recogen en la Figura 5.8 siendo los DAFs **9** y **10** los compuestos mayoritarios en ambos casos. Sin embargo, la proporción del DAF **9** aumenta de manera significativa al pasar de un 5% a un 10% de ácido cítrico a expensas sobre todo del DAF **10**. En general, la conversión de la fructosa en DAFs y fructooligosacaridos superiores es mayor en el segundo caso.

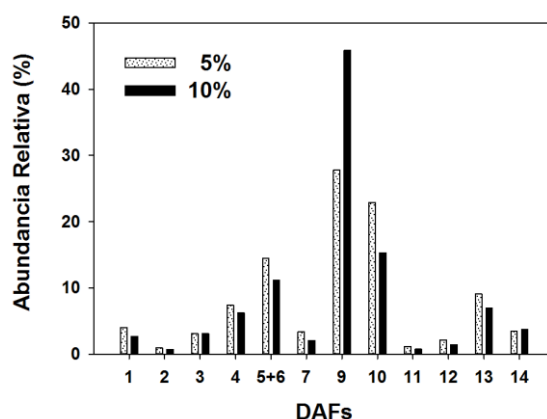


Figura 5.8. Variación de las proporciones de los dihidroacetones de di-D-fructosa durante la caramelización de la D-fructosa (85%) a 90 °C empleando CO₂ (20 bares) y ácido (5% y 10%), durante 12 h.

Con objeto de modular las propiedades organolépticas del caramelo de fructosa enriquecido en DAFs y fructosil-DAFs obtenido a partir de D-fructosa y CO₂ como promotor de la caramelización, se ha estudiado también la decoloración del mismo con carbón vegetal. Para ello, a una disolución de 250 g de caramelo en 1 L de agua se añadieron 100 g de carbón vegetal y se calentó a 100 °C durante 2 h. El análisis por cromatografía de gases del caramelo decolorado mostró una proporción de DAFs muy similar al caramelo original (56% frente a un 55%). En la Figura 5.9 se recogen las proporciones relativas de los DAFs, sin que se aprecien diferencias significativas. El tratamiento con carbón vegetal es, por tanto, un método adecuado para decolorar el caramelo enriquecido en DAFs y glicosil-DAFs sin afectar su composición. Este hecho es especialmente útil a la vista de la posible aplicación como aditivo alimentario en productos en los que el color no sea una característica deseable. Un caso particularmente importante es el de los lácteos, que constituyen el mayor grupo de alimentos funcionales en el mercado y para los que la adición de caramelo enriquecido en DAFs, dadas sus propiedades prebióticas, puede ser ventajosa.

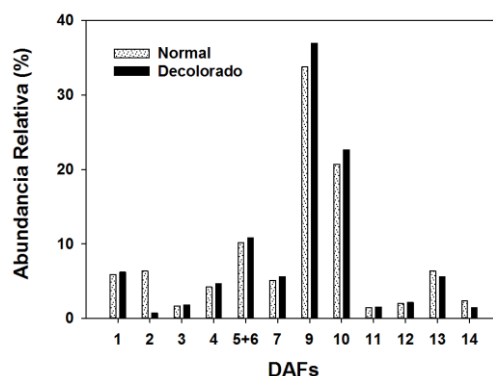


Figura 5.9. Variación de las proporciones de los dianhidridos de di-D-fructosa durante la caramelización de la D-fructosa (85%) a 100 °C empleando CO₂ (20 bares) durante 48 h.

5.2. Caramelización de la Palatinosa® promovida por CO₂.

Para la preparación de caramelo de Palatinosa® con un elevado contenido en glicosil-DAFs, utilizando CO₂ como promotor de la caramelización, se partió de una disolución de Palatinosa® al 85% (peso/volumen en agua), se inyectó CO₂ a 20 bares, y se calentó la mezcla a 90 °C durante 24 y 72 horas (ver Parte Experimental y Tabla 7.5). En los cromatogramas de gases de las alícuotas de caramelos se identificaron los picos correspondientes a los dianhidridos de Palatinosa®. El tiempo de reacción tiene un efecto notable en la velocidad de conversión y la proporción relativa de los dianhidridos de Palatinosa® en el producto final aumenta, alcanzando el 14% y 40% tras 24 y 72 h, respectivamente (Figura 5.10).

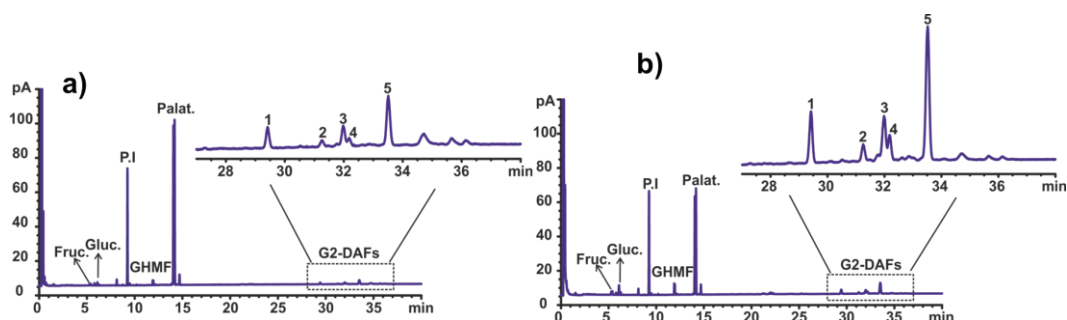


Figura 5.10. Cromatogramas GC-FID de la cinética de caramelización de Palatinosa® (85%) a 90 °C empleando CO₂ (20 bares) durante 24 h (a) y 72 h (b).

Las proporciones relativas de los diferentes dianhidridos de Palatinosa® isoméricos, determinadas a partir del correspondiente cromatograma de gases, se recogen en la Figura 5.11.

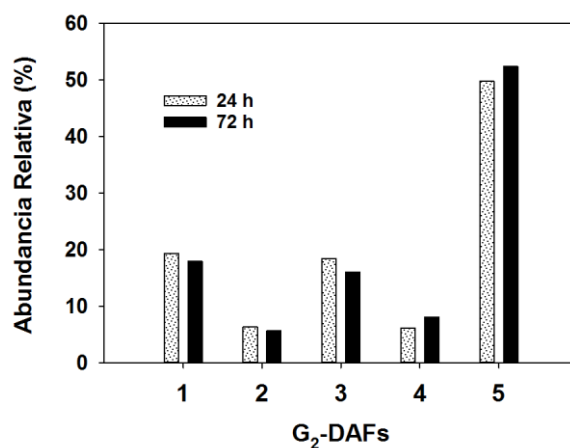


Figura 5.11. Variación de las proporciones de los dianhidridos de Palatinosa® durante la caramelización de la Palatinosa® (85%) a 90 °C empleando CO₂ (20 bares) durante 24 y 72 h.

En el espectro de masas en modo ESI del caramelo se identificaron los picos pseudomecúlares en modo negativo correspondientes a los glicosil-DAFs (desde G-DAFs hasta G₇-DAFs) y a los oligosacáridos clásicos hasta DP 9 (Figura 5.12).

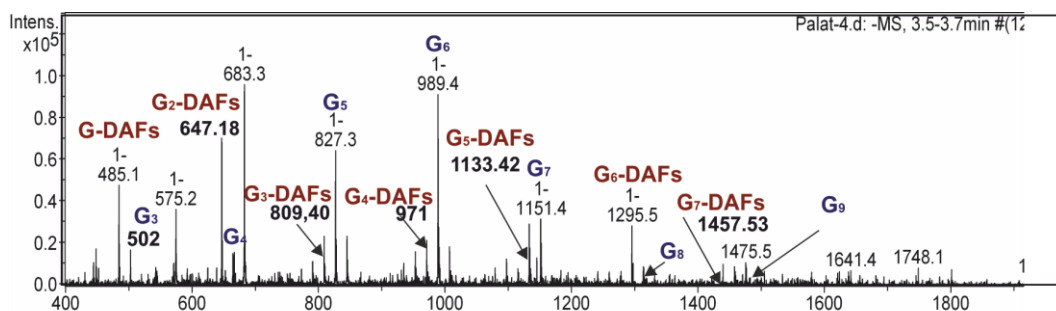


Figura 5.12 Espectros de masas en modo ESI del caramelo obtenido a partir de Palatinosa® (85%) a 110 °C con CO₂ (20 bares) durante 24 h.

Finalmente, se ha estudiado la caramelización de Palatinosa® (85%) en presencia de CO₂ (20 bares) pero aumentando la temperatura de reacción a 110 °C durante 24. En la Figura 5.13 se muestra el perfil cromatográfico del caramelo obtenido en el que se observan proporciones relativas de los dianhidridos de Palatinosa® similares a las obtenidas anteriormente a 90 °C. De hecho, la comparación directa de los tres experimentos llevados a cabo pone de manifiesto que ni el tiempo de reacción ni la temperatura tienen un efecto significativo en las proporciones relativas de los dianhidridos de Palatinosa® isoméricos (Figura 5.14).

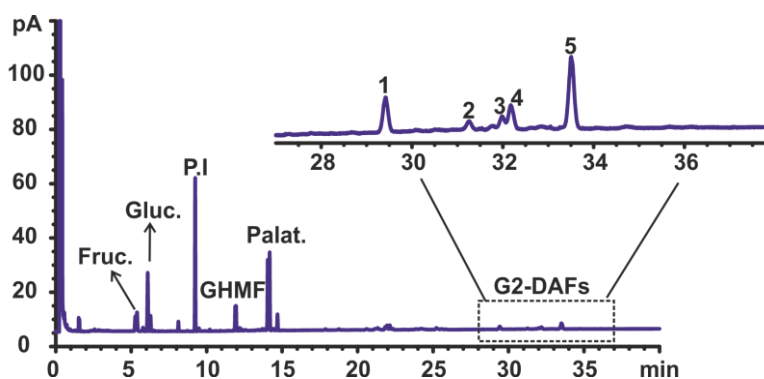


Figura 5.12. Cromatogramas GC-FID de la caramelización de Palatinosa® (85%) a 110 °C empleando CO₂ (20 bares) durante 24 h.

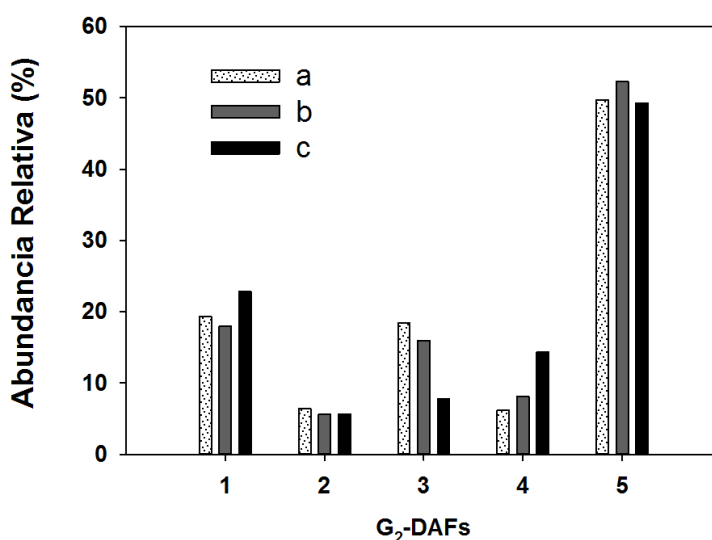


Figura 5.13. Variaciones de las proporciones de los dianhidridos de Palatinosa® durante la caramelización de Palatinosa® (85%) empleando CO₂ (20 bares) a 90 °C y 24 h (a), 90 °C y 72 h (b) y 110 °C y 24 h (c).

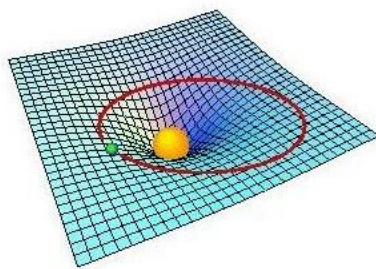
En resumen, los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que el ácido carbónico es capaz de promover la caramelización de la D-fructosa y de la Palatinosa® y que, tras optimización de las condiciones de reacción, puede utilizarse para la preparación de productos enriquecidos en DAFs. Aunque las velocidades de conversión son menores en comparación con las que se observan cuando se usa la resina Lewatit® 2328 (H⁺) o el ácido sulfúrico soportado sobre gel de sílice (SAS), la homogeneidad de las condiciones, la simplicidad del proceso y la ausencia de cualquier contaminación podrían facilitar un posible desarrollo comercial. Es interesante destacar que la menor acidez del ácido carbónico en comparación con los grupos ácidos sobre la resina permite producir un caramelo con proporciones más altas del dianhidrido de control cinético difuranosídico **10**, para el que se han descrito propiedades beneficiosas cuando se usa como diastereómero puro,¹⁵ y de fructooligosacáridos (fructobiosas). La conversión puede además modularse

añadiendo como co-promotor de caramelización un ácido alimentario como el ácido cítrico.

Bibliografía

1. Defaye, J.; Gadelle, A.; Pedersen, C., *Carbohydr. Res.*, **1985**, *136*, 53-65.
2. Defaye, J.; Garcia Fernández, J. M., *Carbohydr. Res.*, **1992**, *273*, 223-247.
3. Defaye, J.; Garcia Fernandez, J. M., *Carbohydr. Res.*, **1994**, *251*, 1-15.
4. Defaye, J.; Garcia Fernandez, J. M., *Carbohydr. Res.*, **1994**, *256*, C1-C4.
5. Defaye, J.; García Fernández, J. M., *Carbohydr. Res.*, **1994**, *251*, 17-31.
6. García Fernández, J. M.; Gadelle, A.; Defaye, J., *Carbohydr. Res.*, **1994**, *265*, 249-269.
7. Saito, K.; Tomita, F., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2000**, *64*, 1321-1327.
8. Wang, X.; Yu, S.; Zhang, T.; Jiang, B.; Mu, W., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2015**, *99*, 175-188.
9. Yu, S.; Wang, X.; Zhang, T.; Stressler, T.; Fischer, L.; Jiang, B.; Mu, W., *PLOS ONE*, **2015**, *10*, e0142640.
10. Yu, S.; Wang, X.; Zhang, T.; Jiang, B.; Mu, W., *Mol. Catal. B: Enzym*, **2015**, *120*, 16-22.
11. Yu, S.; Zhu, Y.; Zhang, T.; Jiang, B.; Mu, W., *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 103791-103794.
12. Su, W. C.; Wong, D. S. H.; Li, M. H., *J. Chem. Eng. Data*, **2009**, *54*, 195.
13. Li, X.; Hou, M.; Han, B.; Wang, X.; Zou, L., *J. Chem. Eng. Data*, **2008**, *53*, 548-550.
14. Liu, F.; Barrault, J.; De Oliveira Vigier, K.; Jérôme, F., *ChemSusChem*, **2012**, *5*, 1223-1226.
15. Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M., *Top. Curr. Chem.*, **2010**, *294*, 49-77.

6. CONCLUSIONES



6. Conclusiones

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis permiten extraer las siguientes conclusiones:

PRIMERA. La activación de la Palatinosa® mediante el uso de catalizadores ácidos heterogéneos, tales como la resina Lewatit® S2328 (H⁺), zeolitas en su forma ácida o sílicas modificadas con los ácidos sulfúrico o fosfórico, a temperaturas moderadas (80-100 °C) permite obtener productos enriquecidos en dianhidridos de Palatinosa® y oligosacáridos superiores. Los diastereoisómeros mayoritarios en la fracción de los dianhidridos de Palatinosa® (pseudotetrasacáridos; G₂-DAFs) son el compuesto **3** (βfβf 1:2'2:3') y el compuesto **5** (αfβf 1:2:1').

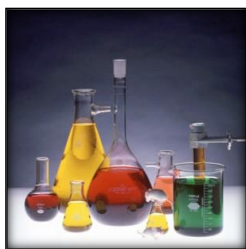
SEGUNDA. Los derivados *O*-protegidos de la 1,2-*O*-isopropilidén-β-palatinosa, con grupos benzoilo o bencilo, son buenos precursores para la síntesis estereoselectiva de dianhidridos de Palatinosa®. En el primer caso, la activación con ácido triflico en medio orgánico condujo a la formación del compuesto **3** (αfαf 1:2'2:1') de manera casi exclusiva en tanto que el segundo, en las mismas condiciones, proporcionó selectivamente el compuesto **5** (αfβf 1:2:1'). Los diastereómeros puros se separaron, se caracterizaron y se emplearon para la puesta a punto de un método analítico para la identificación y cuantificación por cromatografía de gases (CG-FID) de los dianhidridos de Palatinosa®.

TERCERA. La irradiación por microondas es una alternativa viable al calentamiento a temperaturas moderadas para llevar a cabo la transformación de la Palatinosa® en productos enriquecidos en dianhidridos de Palatinosa® utilizando catalizadores heterogéneos. La composición del producto final, sobre todo en lo que se refiere a la proporción de oligosacáridos superiores, puede modularse actuando sobre la potencia de irradiación.

CUARTA. Las sílicas ácidas modificadas con ácido sulfúrico (SAS) o ácido fosfórico (SAF) son también catalizadores eficaces para promover la caramelización de la D-fructosa, la D-glucosa y la D-manosa. Con la sílica SAS se consiguieron conversiones rápidas de la D-fructosa en DAFs y oligosacáridos superiores. La reacción fue mucho más lenta cuando se usó la sílica ácida SAF. Este catalizador puede ser útil para controlar de manera más selectiva la composición del producto final. En el caso de la D-glucosa y la D-manosa, las sílica ácidas SAS y SAF promovieron la conversión en disacáridos y oligosacáridos, observándose igualmente que las conversiones son más rápidas con la primera de ellas. En el caso de la D-manosa se confirmó que la resina Lewatit S2328 (H^+) es también un catalizador eficaz para promover la reacción de reversión. Los compuesto predominantes fueron los manodisacáridos con uniones α y $\beta(1\rightarrow6)$.

QUINTA. El ácido carbónico, formado a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua, es capaz de catalizar la formación de DAFs a partir de D-fructosa en condiciones homogéneas, evitando los problemas de separación del catalizador del producto final. Los DAFs **9** ($\alpha\beta p$) y **10** ($\alpha\beta f$) fueron los productos obtenidos mayoritariamente. El aumento de la presión de CO_2 y de la temperatura aceleran la formación de DAFs y glicosil-DAFs, y conducen a mayores conversiones. El método se ha extendido a la caramelización de Palatinosa®. En este caso, se forman los correspondientes dianhidridos de Palatinosa®, siendo producto mayoritario obtenido el compuesto **5** ($\alpha\beta f 1:2:1'$), seguido del compuestos **3** ($\alpha f, \alpha f 1,2':2,1'$) y **1** ($\alpha f, \beta f 1,2':2,3'$).

7. PARTE EXPERIMENTAL



7. Parte experimental

7.1 Métodos Generales

Cromatografía analítica en capa fina (c.c.f.).

Se ha realizado empleando cromatoplasmas de Aluminio prefabricadas Silica Gel 60 F254 Merck de 0.25 mm de espesor. La detección de los compuestos en las placas se ha realizado por exposición de las mismas a una fuente de luz UV ($\lambda = 254$ nm) y mediante revelado por inmersión en disoluciones de ácido sulfúrico al 10 % en etanol.

Cromatografía preparativa en columna

La cromatografía en columna se ha realizado empleando como relleno Sílice 60 Å cromagel SdS 60 (tamaño de partícula 200-60 μm y 60-35 μm), eluyendo por gravedad o sometiendo o aplicando una ligera presión.

Poder rotatorio.

Se han medido a 20 ± 2 °C en un espectropolarímetro Perkin–Elmer 341 empleando la línea D del sodio ($\lambda = 589$ nm), concentraciones del 0.5-1% y celdas de 1 dm.

Análisis elemental.

Se han realizado en el Centro de Investigaciones Científicas “Isla de la Cartuja” (CSIC-Universidad de Sevilla) usando un analizador elemental *Leco TruSpec*® CHN.

Espectros de absorción en el IR.

Se han realizado en un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27. Se han registrado a partir de muestras preparadas en pastilla de bromuro potásico o dispuesto en película entre dos celdas de cloruro sódico, presentándose los datos indicando los números de onda correspondientes a los máximos de absorción.

Espectros de absorción en el UV.

Se han registrado en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 750, siendo el camino óptico de 1 cm. Las concentraciones empleadas están comprendidas entre 10^{-4} y 10^{-5} M.

Resonancia Magnética Nuclear.

Los Espectros de ^1H RMN. Se han registrado en espectrómetros *Bruker Avance 400* (400 MHz) y *Bruker Avance 500* (500 MHz) utilizando disoluciones en CDCl_3 y D_2O . La asignación de las señales se ha completado con la realización de experimentos de correlación homonuclear 2D COSY (*Correlated Spectroscopy*), 1D y 2D TOCSY (*Totally Correlated Spectroscopy*). Los valores de desplazamiento químico (δ) se dan en ppm, usando como referencia interna el disolvente. Los valores de las constantes de acoplamiento (J) se miden en Hz. Las abreviaturas para indicar la multiplicidad de las señales son: s (singulete), sa (singulete ancho), d (doblete), t (triplete), c (cuartete), q (quintete) y m (multiplete).

Los **espectros de ^{13}C RMN** se han registrado a 100.5 y 125.7 MHz en los espectrómetros indicados para ^1H RMN. Para la interpretación de algunos espectros se han empleado técnicas de correlación heteronuclear 2D ^1H - ^{13}C (HMQC, ^1H -detection mode Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence).

Espectrometría de masas.

Las experiencias realizadas fueron:

- Ionización por electrospray EM(ESI), utilizando un espectrómetro Bruker Esquire6000. Para ello se emplearon disoluciones de las muestras en H₂O, MeOH, o sus mezclas, de concentración en el rango μM . Las muestras se introdujeron mediante inyección directa usando una jeringa Cole-Palmer a un flujo de 120 $\mu\text{L/h}$.

- Ionización por laser asistida por matriz (MALDI), utilizando un equipo Bruker MALDI-TOF Microflex y ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA). Se emplearon concentraciones de muestra de 1.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en H₂O conteniendo 0.05% de ácido trifluoroacético (TFA).

Identificación y cuantificación de DAFs y glicosil-DAFs por cromatografía de gases (CG)

Derivatización de muestras para CG. Las alícuotas tomadas directamente del matraz o reactor (100 ó 150 mg) para su análisis por CG se disuelven en 1 mL de agua destilada, se centrifugan en una microcentrifuga de sobremesa Orto Alresa BIOCEN20 y se liofilizan. Se prepara una disolución del liofilizado en agua (16 mg mL^{-1}) de la que se toma una alícuota (100 μL). A esta se le añade una disolución de fenil β -D-glucopiranosido (patrón interno) en acetona-agua (1:9 v/v, 4 mg mL^{-1} , 100 μL) y la disolución resultante se vuelve a liofilizar en un vial.

Para poder llevar a cabo el *análisis por CG*, las muestras deben primero derivatizarse con objeto de transformar los azúcares presentes en derivados volátiles. Cuando los componentes fundamentales de la muestra son oligosacáridos no reductores, como es el caso de los dianhidridos de fructosa y sus derivados glicosilados, el método más

conveniente consiste en la secuencia de reacciones de oximación-trimetilsililación que se describe a continuación

Método de oximación-trimetilsililación: La muestra liofilizada conteniendo el patrón interno se disuelve en 1 mL de una disolución de hidroxilamina en piridina ($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) y se calienta en baño de agua durante 50 minutos a 60°C . De esta manera, los azúcares reductores presentes se transforman en las correspondientes oximas, quedando inalterados los azúcares no reductores. A continuación, se añaden $200 \mu\text{L}$ de hexametildisilazana y $100 \mu\text{L}$ de trimetilclorosilano y se continúa el calentamiento a 60°C durante 40 minutos. Al terminar esta etapa de trimetilsililación, se observa la formación de un precipitado de color blanco que se separa por centrifugación (8.5 rpm , 2.5 min , t.a.) antes de efectuar la inyección en el cromatógrafo de gases¹.

Instrumentación y condiciones cromatográficas. Para el análisis de DAFs, los cromatogramas en gases se obtuvieron con un cromatógrafo Agilent 7820A, con un detector de ionización de llama (FID) y los datos fueron adquiridos mediante el software ChemStation. Para el análisis de derivados disacáridicos (dianhidridos de fructosa, glucodisacáridos o manodisacáridos) se ha utilizado una columna capilar de 5% fenilmetilpolisiloxano modelo HP5 ($30 \text{ m} \times 320 \mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m}$). Las condiciones del análisis son: split de 25:1; temperatura del inyector, 310°C ; temperatura del detector 325°C ; volumen de inyección $1 \mu\text{L}$; temperatura del horno programada desde 180 a 310°C con una rampa de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ y manteniendo esta última temperatura durante 5 min; gas portador helio a flujo constante de $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Tiempo total de adquisición 31 min.

Para el análisis de glicosil-DAFs se utiliza una columna capilar de 100% dimetilpolisiloxano modelo CP-SIL 5 CB ($7.5 \text{ m} \times 250 \mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m}$). Las condiciones del análisis son: temperatura del inyector, 280°C ; temperatura del detector: 365°C ; volumen de inyección $1 \mu\text{L}$; temperatura del horno programada de 130 a 165°C , con una

rampa de $10\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, se mantiene 2 min, se aplica otra rampa de $10\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ hasta $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, otra rampa de $1\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ hasta $257\text{ }^{\circ}\text{C}$, otra rampa de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ hasta $270\text{ }^{\circ}\text{C}$, otra rampa de $3\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ hasta $325\text{ }^{\circ}\text{C}$ y finalmente esta temperatura se mantiene durante 20 min. Tiempo total de adquisición 59 min.

Desarrollo de un método analítico para la identificación y cuantificación de disacáridos y oligosacáridos de D-glucosa y D-manosa

Mientras que el método analítico para la cuantificación de DAFs en caramelos de fructosa por cromatografía de gases, previa derivatización de las muestras mediante oximación-trimetilsililación, estaba bien puesto a punto con anterioridad a esta Tesis,² el análisis cromatográfico de oligosacáridos de reversión reductores derivados de glucosa y manosa requirió el desarrollo y puesta a punto de protocolos adecuados que se describen en los párrafos que siguen a continuación.

Las derivatizaciones más utilizadas de los grupos hidroxilo de los azúcares para su análisis por cromatografía de gases son la metilación, la acetilación y la trimetilsililación. En forma de derivados trimetilsililados (TMS), los azúcares reductores pueden conducir a seis picos cromatográficos que corresponden a los isómeros de piranosa y furanosa, a los anómeros α y β y a las formas lineales carbonilo e hidrato³. Cuando varios azúcares reductores coexisten en un mismo producto, los cromatogramas obtenidos son, consecuentemente, muy complejos. La multiplicidad de los picos presenta además el inconveniente de que reduce la sensibilidad del método. Para paliar este problema se introduce la etapa de oximación previa, en la que los azúcares reductores son convertidos en las correspondientes oximas antes de ser transformados en componentes volátiles. Esta doble derivatización reduce a dos el número de picos que originan los azúcares reductores, los correspondientes a las formas *sin* y *anti* de las correspondientes oximas. En cuanto a los azúcares no reductores, éstos no pueden ser oximados por lo que, en las mismas condiciones, dan lugar a un sólo pico correspondiente a los derivados

trimetilsililados. Es el caso de los DAFs. Para la derivatización de los caramelos de D-glucosa y D-manosa, previa a su inyección en el cromatógrafo de gases, se consideró la secuencia de reacción de formación de peracetatos de aldnonitrilos (Figura 7.1).

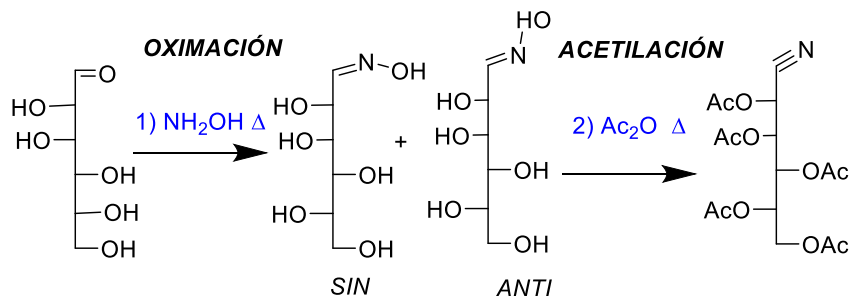


Figura 7.1. Reacciones de derivatización de oximación-acetilación de la D-manosa.

Las condiciones experimentales para la formación de los peracetatos de aldnonitrilos son las siguientes: La primera etapa en este método de derivatización consiste en una reacción de oximación utilizando las mismas condiciones descritas para el análisis de DAFs. En una segunda etapa, se adiciona se adiciona 1 mL de anhídrido acético (Ac_2O) y la mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 40 minutos.⁴

Parámetros cromatográficos: Las condiciones del análisis son: split de 25:1; temperatura del inyector, 310 °C; temperatura del detector 325 °C; volumen de inyección 1 µL; temperatura del horno programada desde 180 a 310 °C con una rampa de 10 °C·min⁻¹ y manteniendo esta última temperatura durante 5 min; gas portador helio a flujo constante de 1.2 mL·min⁻¹. Tiempo total de adquisición 31 min.

Determinación de los tiempos de retención y factores de respuesta para patrones puros de D-glucosa, D-manosa y los disácaridos usados como patrón

Con objeto de poder cuantificar los diferentes gluco- y mano- disacáridos en los caramelos de D-glucosa y de D-manosa, se han determinado los factores de respuesta para cada uno de ellos utilizando patrones puros. La linealidad de la respuesta para cada patrón se evaluó mediante una recta de regresión que relaciona las concentraciones de los compuestos y el área de los picos cromatográficos, empleando en todos los casos fenil β-D-glucopiranosido como patrón interno. En la Figura 7.2, se muestran las rectas de regresión obtenidas para los disacáridos maltosa, isomaltosa, gentiobiosa y trehalosa y en la Tabla 7.1 se incluyen los tiempos de retención y los factores de respuesta correspondientes a la D-glucosa y los glucodisacáridos usados como patrón. La Figura 7.3 y la Tabla 7.2 recogen los datos experimentales correspondientes a la D-manosa y los manodisacáridos y manotrisacárido empleados como patrones para el estudio de la caramelización de la D-manosa.

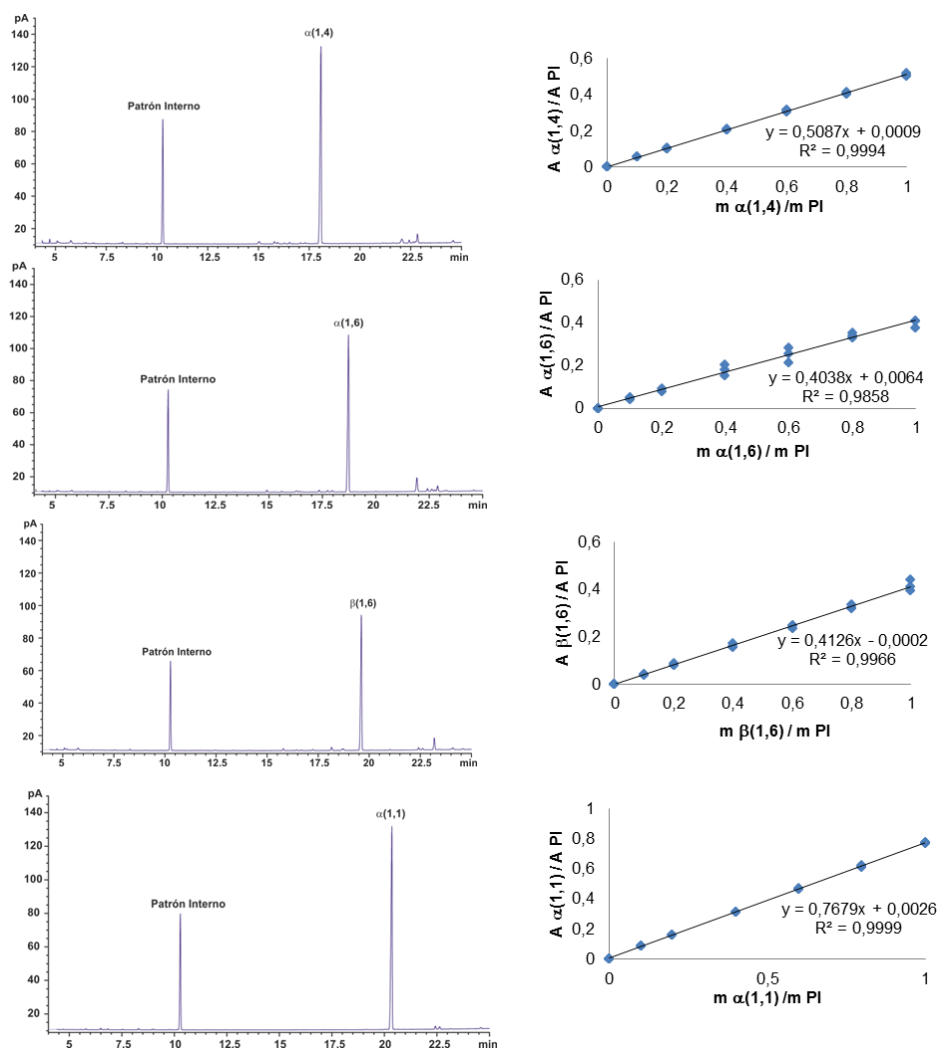


Figura 7.2. Cromagramas GC-FID y rectas de calibrado correspondientes a los patrones de maltosa (a), isomaltosa (b), gentiobiosa (c) y trehalosa (d).

Tabla 7.1. Tiempos de retención (min) y factores de respuesta (K_r) para la D-glucosa y los glucodisacáridos patrones en la cromatografía (GC-FID).

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Factor de respuesta (K_r)
D-Glucosa	4.188	0.66
α -Glc(1 \rightarrow 2)Glc (<i>Kojibiosa</i>)	17.413	0.39
α -Glc(1 \rightarrow 4)Glc (<i>Maltosa</i>)	17.718	0.51
α -Glc(1 \rightarrow 3) Glc (<i>Nigerosa</i>)	17.967	0.43
β -Glc(1 \rightarrow 3)Glc (<i>Laminaribiosa</i>)	18.098	0.24
β -Glc(1 \rightarrow 4)Glc (<i>Celobiosa</i>)	18.334	0.68
α -Glc(1 \rightarrow 6)Glc (<i>Isomaltosa</i>)	18.385	0.40
α -Glc(1 \rightarrow 1) α Glc (<i>Trehalosa</i>)	18.512	0.74
β -Glc(1 \rightarrow 2)Glc (<i>Soforosa</i>)	19.131	0.34
β -Glc(1 \rightarrow 6) Glc (<i>Gentiobiosa</i>)	19.292	0.41
α -Glc(1 \rightarrow 1) β Glc (<i>Neotrehalosa</i>)	20.006	0.77

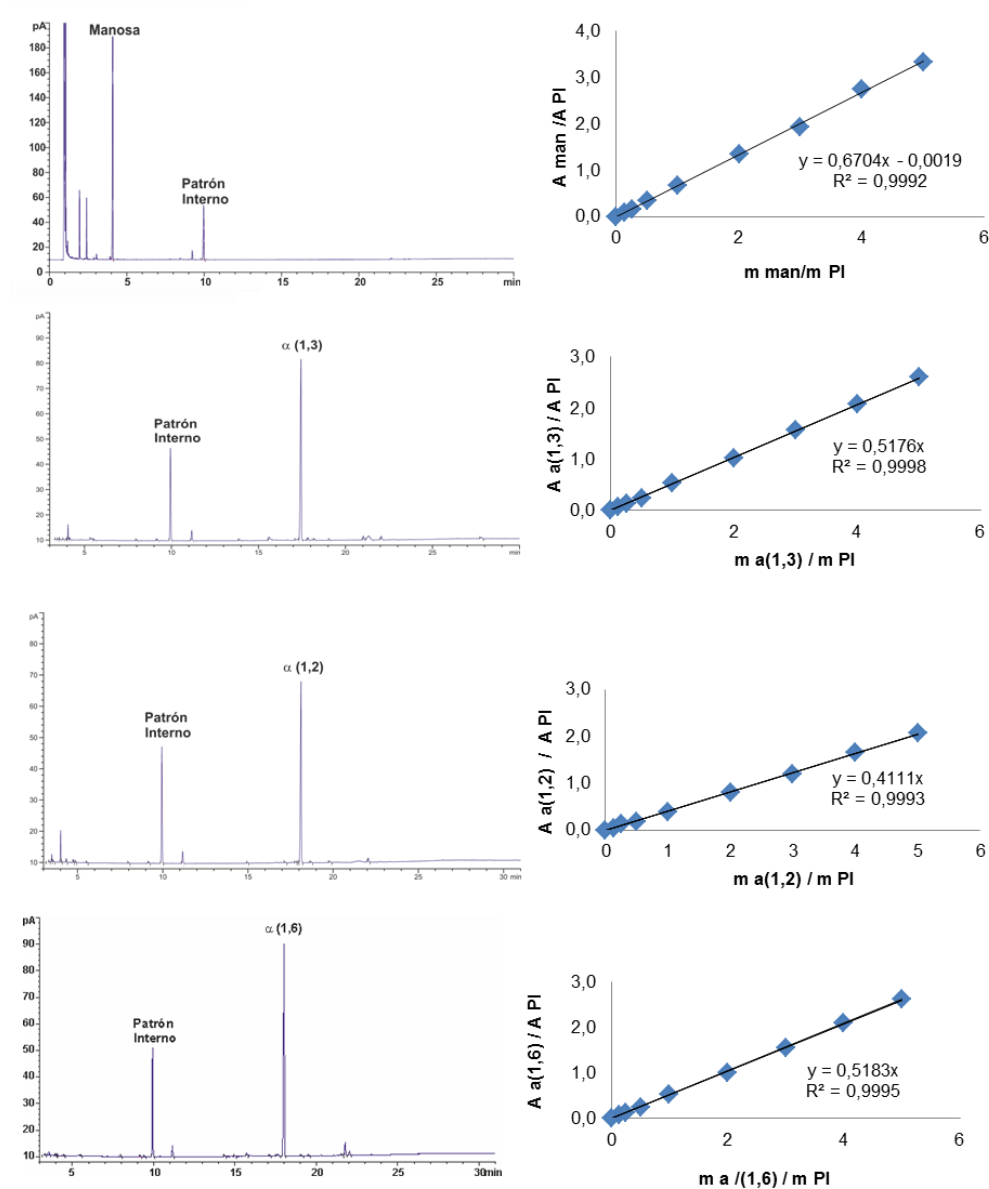


Figura 7.3. Cromatogramas (GC-FID) y rectas de calibrado correspondientes a los patrones de D-manosa (a) y de los manodisacáridos α -Manp(1→2)Manp (b), α -Manp(1→3)Manp (c) y α -Manp(1→6)Manp (d).

Tabla 7.2 Tiempos de retención (min) y factores de respuesta (K_r) para la D-manosa y los manodisacáridos y manotrisacáridos patrones en la cromatografía (GC-FID).

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Factor de respuesta(K_r)
D-manosa	4.00	0.67
$\alpha(1\rightarrow3)$ -Manp-Manp	17.15	0.51
$\alpha(1\rightarrow4)$ - Manp-Manp	17.40	0.48
$\beta(1\rightarrow3)$ - Manp-Manp	17.85	0.48
$\alpha(1\rightarrow6)$ - Manp-Manp	18.00	0.51
$\alpha(1\rightarrow2)$ - Manp-Manp	18.08	0.47
$\beta(1\rightarrow4)$ - Manp-Manp	18.22	0.41
$\beta(1\rightarrow2)$ - Manp-Manp	18.70	0.48
$\beta(1\rightarrow6)$ - Manp-Manp	19.08	0.48
1,6- α -D-manotriosa	28.75	0.32

Determinación del perfil de ramificación de manooligosacáridos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS)

Las muestras de manooligosacáridos previamente liofilizadas se metilaron usando el método de Ciucanu y Costello⁵ para ello la muestra (1 mg) se disolvió en 10 μ L de agua y se añadió 0.5 mL de dimetilsulfoxido (DMSO) bajo agitación. A esta disolución se añaden yoduro de metilo (50 μ L) e hidróxido sódico finalmente pulverizado (5 mg) y la suspensión resultante se agita vigorosamente durante 1 min. Tras este tiempo, se añade una cantidad adicional de hidróxido sódico (15 mg) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 10 min, tras lo cual se reparte entre agua (2 mL y diclorometano (2 mL). La fase orgánica se separa, se lava con agua (3-4 mL) y se seca bajo un corriente de nitrógeno. El producto así permetilado se somete a una secuencia de hidrólisis, reducción con NaBD₄, y acetilación siguiendo el método de Kim y colaboradores⁶. Brevemente, la muestra permetilada se hidroliza para dar los monosacáridos constituyentes por tratamiento con TFA 2 M (250 μ L) a 131 °C durante 2 h. El TFA se elimina por coevaporación con gotas de metanol, el residuo seco se disuelve en NaBD₄ acuoso (10 mg \cdot mL⁻¹, 100 μ L) y la disolución resultante se agita durante 1 h. Al cabo de este tiempo

se detiene la reducción por adición de 1 gota de ácido acético glacial y se seca por coevaporación con metanol (3 x 100 μ L). La mezcla de alditoles parcialmente metilados así obtenidos se acetila por reacción con Ac_2O (100 μ L) y TFA (80 μ L) a 50 ° C durante 10 min, se seca por coevaporación con acetona, el residuo se reparte entre diclorometano (2 mL) y agura (4 x 2 mL), la fase orgánica se seca (Na_2SO_4) y se concentra a sequedad. Finalmente el residuo se redisuelve en diclorometano (50 μ L) antes de inyectar en el aparato CG-MS.

Para registrar los espectros de CG-MS se utilizó un cromatógrafo Shimadzu GC-2010 equipado con una columna ZB-5MS (10 m \times 0,18 mm \times 0,18 mm) y conectado a un espectrómetro de masas Shimadzu GCMS-QP2010 Plus. El potencial de ionización es de 70 eV y los espectros se registraron en el modo de baja resolución. Las condiciones de análisis son: Temperatura del inyector 275 °C; relación de split 5:1; volumen de inyección 1 μ L. El programa de temperatura es: 120 °C durante 1 min seguido de un gradiente de temperatura de 3 °C/min hasta 190 °C y un gradiente de temperatura de 20 °C/min hasta 250 °C, temperatura que se mantiene durante 2,67 min. El gas portador es helio a un flujo constante de 0.7 mL min⁻¹, el tiempo de adquisición total es de 30 min. La identificación de los acetatos de alditol metilados / acetilados se basó en la comparación de los tiempos de retención y de los espectros de masa correspondientes con datos para patrones estándares auténticos⁷

Cromatografía Iónica

Los *cromatogramas iónicos* se obtuvieron en un cromatógrafo iónico Metrohm modelo 850 Profesional IC. El equipo consta de un sistema Autosampler (AS Autosample), una bomba iPump, un módulo de depósito y desgasificación de eluyentes y un detector amperométrico de pulso (PAD). Los datos fueron adquiridos mediante el software MagIC NetTM.

Instrumentación y condiciones cromatográficas.

En todos los casos se ha utilizado una Columna Hamilton RCX-30 Anion con una precolumna Metrosep CO₃ Trap 1 100/4. Los eluyentes utilizados para el análisis de carbohidratos fueron disoluciones acuosas de hidróxido sódico (eluyente A) e hidróxido sódico-acetato de sodio (eluyente B). Los reservorios de los eluyentes se mantienen presurizados con N₂ durante el análisis para evitar la disolución de CO₂.

- Composición del eluyente A: 100 mM NaOH
- Composición del eluyente B: 100 mM NaOH – 500 mM AcONa.
- Gradiente: 95% A+5% B (10 min), 92% A+8% B (30 min, tipo cóncavo 4), 100% B (10 min, tipo cóncavo 1), 100%B (5 min, lineal) y 95% A+5% B (15 min, líneal)

Figura 7.4.

- Tiempo total de adquisición 70 min.
- Inyección 1 µL.

Las disoluciones de las sustancias patrones y de las muestras fueron preparadas por pesada en balanza (Mettler AE240) de cantidades comprendidas entre 5-10 mg y posterior disolución en agua ultrapura de calidad milli Q (Millipore, Waters).

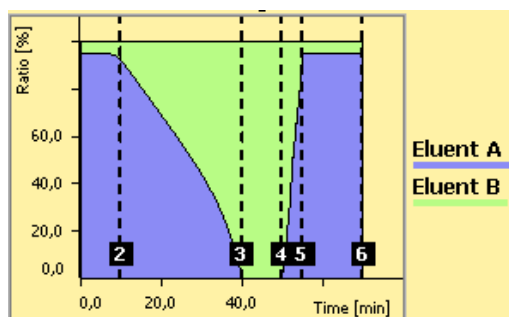


Figura 0.4. Diagrama de evolución del método optimizado para el HPAEC-PAD.

Acondicionamiento y determinación de la capacidad de intercambio de resinas y otros catalizadores heterogéneos.

Acondicionamiento de resina de intercambio iónico en su forma ácida. La resina correspondiente (0.5 Kg) se coloca en una columna y se eluye lentamente con 2 L de MeOH, 2 L de agua, 2 L de HCl 1 N y, finalmente, 2 L de agua. Posteriormente, se seca pasando aire durante dos horas y después en una estufa a 100 °C durante uno o dos días.

Preparación de la sílica $H_2SO_4 \cdot SiO_2$ (SAS). En un matraz se coloca una suspensión de sílica (10 g) en dietil éter seco (50 mL) y se añade lentamente H_2SO_4 del 95% (3 mL) bajo agitación durante 5 min. El disolvente se evapora bajo presión reducida y el sólido blanco obtenido se calienta a 120 °C durante 3 h.⁸

Preparación de la sílica $H_3PO_4 \cdot SiO_2$ como catalizador (SAF). A una suspensión de sílica (5 g) en cloroformo (30 mL) se añade lentamente H_3PO_4 (1.8 mL), con agitación durante 2 h. El cloroformo se elimina a presión reducida a 40 °C, el polvo blanco se torna en gris y se seca en la bomba de aceite a 100 °C y se colocó en paralelo con un matraz con NaOH aproximadamente 2 h.⁹

Acondicionamiento de zeolitas. Las zeolitas que hemos usado en esta tesis fueron suministradas por la compañía Degussa (Alemania) en su forma sódica. Sus denominaciones comerciales y los correspondientes módulos (proporciones Si/Al) son FAU15, FAU56 y FAU110. Para preparar las correspondientes formas ácidas, la zeolita (100 g) se colocó en un matraz de tres bocas de 2 L y se añadió 1 L de disolución de NH_4Cl 0.2 M. La suspensión resultante se calentó a 90 °C y se agitó durante 3 h. Pasado este tiempo se retiró de la fuente de calor y se dejó reposar en ausencia de agitación. El sobrenadante se decantó y la zeolita se suspendió en agua destilada (1 L), y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó (5000 g durante 30 min), se decantó y se volvió a agitar en agua destilada (1 L) durante 30 min. Este proceso

se repitió 3 veces. La zeolita resultante se secó durante una noche en estufa a 110 °C y después se pasó a un horno mufla en el que la temperatura fue aumentando de 100 a 450° C (1° C/min) y se mantuvo durante 4 h a 450° C. Las zeolitas acondicionadas de esta manera se almacenaron sobre P₂O₅.

Determinación de la capacidad de intercambio de los diferentes catalizadores ácidos heterogéneos. La capacidad de intercambio de los catalizadores se efectuó mediante valoración directa con NaOH 0.1 N, previamente titulada con disolución acuosa de ftalato ácido de potasio, utilizando suspensiones en agua bajo agitación. En todas las valoraciones se usó fenolftaleína como indicador. Los valores experimentales, calculados como el promedio de tres determinaciones independientes son:

Resina Lewatit S2328: 4.34 meq H⁺/g resina.

Silica H₂SO₄-SiO₂: 6.44 meq H⁺/g resina.

Silica H₃PO₄-SiO₂: 4.04 meq H⁺/g resina.

Reacciones de acetilación

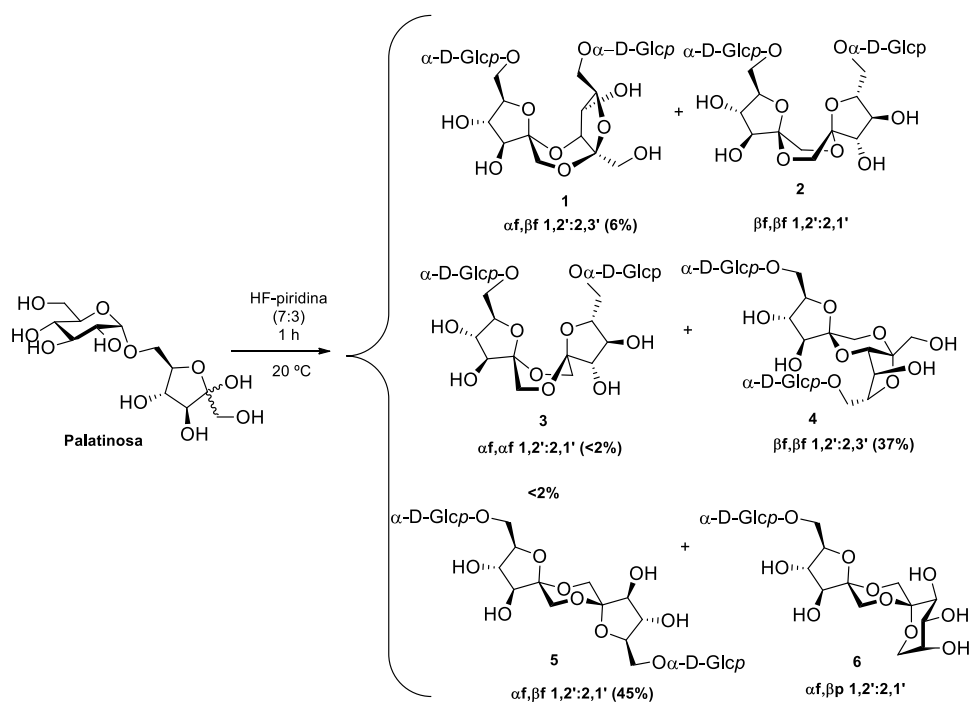
Se llevaron a cabo disolviendo el compuesto en una mezcla de Ac₂O/py (1:1, 10 mL por 1 g de compuesto). La mezcla de reacción se agitó 16 h a temperatura ambiente y se vertió sobre agua/hielo, se extrajo con CH₂Cl₂, la fase orgánica se lavó sucesivamente con H₂SO₄ 2N y disolución saturada de NaHCO₃ en agua, se secó (MgSO₄) y se concentró.

Reacciones de desacetilación

Se siguió el método de Zemplén, usando MeONa 1 M en MeOH seco (0.1 eq por mol de acetato).

7.2 Preparación de dianhidridos de Palatinosa® y caramelos enriquecidos en dianhidridos de Palatinosa®

7.2.1. Preparación de dianhidridos de Palatinosa® mediante activación con poli(fluoruro de hidrógeno) piridinio



Esquema 0.1. Productos formados por la acción del complejo HF-piridina (7:3) sobre la Palatinosa® durante 1 h a 20 °C.

La Palatinosa® (4 g) se hace reaccionar con el complejo fluoruro de hidrógeno-piridina (7:3) (16 mL) en un bote de polietileno, durante 1 hora a 20 °C. El producto se precipita por adición de éter dietílico (4 x 20 mL) y se tritura con acetona (4 x 20 mL), para dar un sólido blanco amorfo que se separa por decantación y se seca a vacío. La

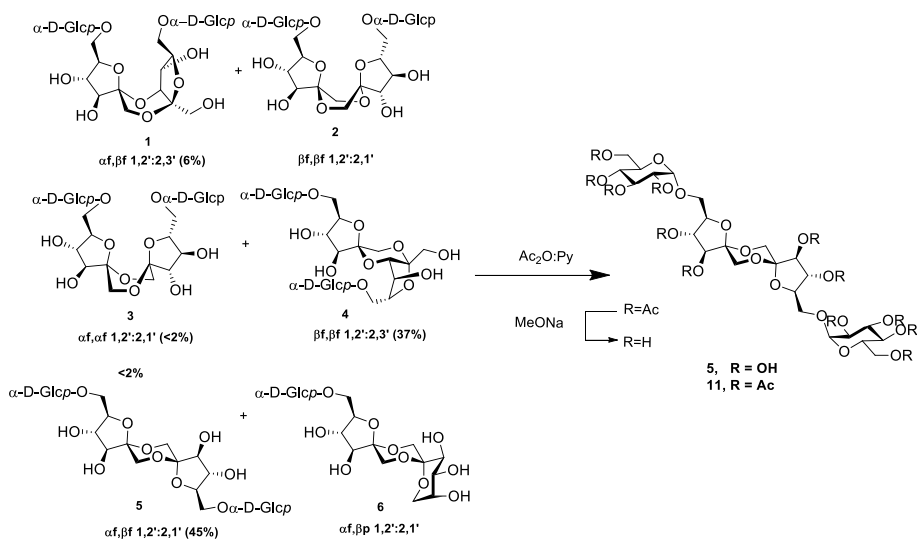
composición de la mezcla resultante de dianhidridos de Palatinosa (glicosil-DAFs), determinada por ^{13}C RMN siguiendo el procedimiento descrito,¹⁰ se recoge en la tabla 7.3.

Tabla 7.3. Composición de la mezcla de dianhidridos de Palatinosa[®] obtenida por reacción (7:3) con HF-Piridina.

Compuesto	Estructura	Proporción (%)
1	$\alpha\text{f},\beta\text{f } 1,2':2,3'$	12
2	$\beta\text{f},\beta\text{f } 1,2':2,1'$	^a -
3	$\alpha\text{f},\alpha\text{f } 1,2':2,1'$	4
4	$\beta\text{f},\beta\text{f } 1,2':2,3'$	32
5	$\alpha\text{f},\beta\text{f } 1,2':2,1'$	52

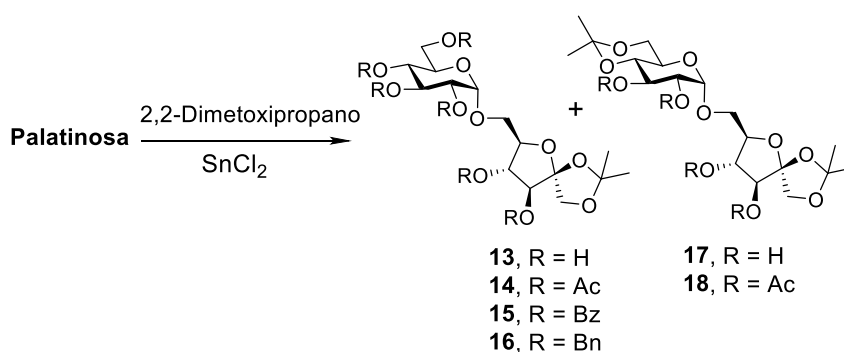
^a No identificado en el espectro de ^{13}C RMN, pero detectado por cromatografía de gases

7.2.2. Separación del dianhidrido de Palatinosa[®] $\alpha\text{f},\beta\text{f } 1,2':2,1'$ (**5**) de la mezcla obtenida por reacción con HF-Py.



La mezcla de dianhidridos de Palatinosa obtenida como se indica en el parrafo anterior (3,45 g) se acetilo de manera convencional por tratamiento con piridina y anhídrido acético (1:1) durante 16 h. El producto peracetilado se cristalizó de EtOH 96%, obteniéndose el compuesto **11**. La desacetilación de **11** con metilato sódico en metanol proporcionó el 6-*O*- α -D-glucopiranosil- α -D-fructofuranosa 6-*O*- α -D-glucopiranosil- β -D-fructofuranosa 1,2':2,1'-dianhidrido (**5**) de manera cuantitativa, cuyos datos de ^{13}C RMN fueron idénticos a los descritos en la bibliografía.⁸

7.2.3. Preparación de derivados acetalados de Palatinosa (**13-18**)



A una disolución de Palatinosa[®] (2 g, 5.84 mmol), en 1,4-dioxano seco (40 mL), se añadió 2,2-dimetoxipropano (2.2 mL, 17.52 mmol) y SnCl₂ (1,83 mg, 0.017 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, bajo atmosfera de N₂ y se neutralizó con piridina (20 gotas). Se filtró la Palatinosa[®] que no reaccionó y la disolución resultante se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna (45:10:3 AcOEt-EtOH-H₂O), obteniéndose así **13** (1,37 g; 61%) y **17** (0.6 g; 24%).

1,2-*O*-Isopropiliden- β -palatinosa (13). R_f 0.31 (45:10:3 EtOAc–EtOH–H₂O); $[\alpha]_D = +13.4$ (c 1.0, MeOH)

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 4.98 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1 Glu), 4.09–4.03 (2d, 2 H, $^2J_{H,H} = 9.9$ Hz, H-1 Fru), 4.03 (d, 1 H, $J_{3,4} = 0.8$ Hz, H-3 Fru), 3.98 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 6.1$ Hz, H-4 Fru), 3.96–3.90 (m, 1 H, H-5 Fru), 3.78 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 11.2$ Hz, $J_{5,6a} = 6.3$ Hz, H-6a Fru), 3.76 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 11.9$ Hz, $J_{5,6a} = 4.7$ Hz, H-6a Glu), 3.71 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.3$ Hz, H-6b Glu), 3.67 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1$ Hz, H-3 Glu), 3.61 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 2.5$ Hz, H-6b Fru), 3.63–3.58 (m, 1 H, H-5 Glu), 3.48 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, H-2 Glu), 3.36 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, H-4 Glu), 1.45–1.34 (2 s, 6 H, CMe₂).

¹³C RMN (125.5 MHz, D₂O): δ 112.3 (CMe₂), 108.4 (C-2 Fru), 98.3 (C-1 Glu), 78.8 (C-5 Fru), 75.2 (C-4 Fru), 74.3 (C-3 Fru), 73.0 (C-3 Glu), 71.8 (C-5 Glu), 71.4 (C-2 Glu), 70.0 (C-1 Fru), 69.3 (C-4 Glu), 68.6 (C-6 Fru), 60.3 (C-6 Glu), 26.1, 24.77 (CMe₂)

ESI/MS: m/z 382 ([M + Na]⁺).

Anal. Calcd. para C₁₅H₂₆O₁₁: C 47.12; H 6.85. Encontrado: C 46.84; H 6.50.

3,4,2',3',4',6'-Hexa-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropiliden- β -palatinosa (14). El compuesto **13** (673 mg, 1,87 mmol) se acetiló con piridina y anhídrido acético (1:1) durante 24 h y se purificó por cromatografía en columna (2:3 EtOAc–éter de petróleo). Rend.: 1.02 g (89%). $R_f = 0.39$ (1:3 EtOAc–éter de petróleo); $[\alpha]_D = +18.5$ (c 1.0, DCM).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.45 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.6$ Hz, H-3 Glu), 5.37 (t, 1 H, $^3J_{H,H} = 6.7$ Hz, H-4 Fru), 5.31 (d, 1 H, $^2J_{H,H} = 6.7$ Hz, H-3 Fru), 5.13 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1 Glu), 5.07 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, H-4 Glu), 4.88 (dd, 1 H, H-2 Glu), 4.26 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, $J_{5,6a} = 4.0$ Hz, H-6a Glu), 4.14–4.05 (m, 1 H, H-5 Glu), 4.14–4.05 (m, 1 H, H-6a Glu), 4.13–4.06 (m, 1 H, H-5 Fru), 4.11–4.06 (2d, 2 H, $^2J_{H,H} = 9.9$ Hz, H-1 Fru),

3.84 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 10.4$ Hz, $J_{5,6a} = 6.21$ Hz, H-6a Fru), 3.69 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.8$ Hz, H-6b Fru), 2.1-1.97 (4s, 12 H, Ac), 1.48-1.31 (2d, 2 H, CMe₂).

¹³C NMR (125.5 MHz, D₂O): δ 170.8-169.6 (CO), 112.2-108.8 (CMe₂), 95.9 (C-1 Glu), 78.2 (C-5 Glu), 76.3 (C-4 Fru), 75.7 (C-3 Fru), 71.2 (C-5 Fru), 70.6 (C-2 Glu), 70.2 (C-3 Glu), 69.0 (C-6 Fru), 68.5 (C-4 Glu), 67.5 (C-1 Fru), 61.8 (C-6 Glu), 26.4-25.9 (CMe₂), 20.8-20.7 (C-Ac).

ESI/MS: m/z 634 ([M + Na]⁺). HRFABMS Calcd. para C₂₇H₃₈O₁₇Na ([M + Na]⁺): 657.2001. Encontrado: 657.1991

3,4,2',3',4',6'-Hexa-O-benzoil-1,2-O-isopropiliden-β-palatinosa (15). A una disolución de **13** (613 mg, 1.60 mmol) en piridina (8 mL) se añadió cloruro de benzoilo (1.9 mL, 16.35 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. Se añadió una mezcla de agua-hielo (40 mL), la fase orgánica se extrajo con DCM (2 x 20 mL), se lavó con agua, se secó (Na₂SO₄) y se concentró a vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (1:3 AcOEt-éter de petróleo). Rend: 05 g (65%). $R_f = 0.39$ (1:3 AcOEt-éter de petróleo); $[\alpha]_D = +15.6$ (c 1.0, DCM).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 8.18-7.21 (m, 30 H, Bz), 6.28 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.8$ Hz, H-3 Glu), 5.78 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 6.7$ Hz, $J_{4,5} = 5.2$ Hz, H-4 Fru), 5.75 (d, 1 H, $J_{H,H} = 6.6$ Hz, H-3 Fru), 5.75 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 5.1$ Hz, H-4 Glu), 5.54 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1 Glu), 5.42 (dd, 1 H, H-2 Glu), 4.67-4.61 (m, 1 H, H-5 Glu), 4.67-4.61 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 12.9$ Hz, $J_{5,6a} = 6.5$ Hz, H-6a Glu), 4.56-4.50 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 5.7$ Hz, H-6b Glu), 4.48 (m, 1 H, H-5 Fru), 4.37-4.16 (2d, 2 H, $J_{H,H} = 9.4$ Hz, H-1 Fru), 4.20-4.15 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 11.1$ Hz, $J_{5,6a} = 7.4$ Hz, H-6a Fru), 4.09 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.1$ Hz, H-6b Fru), 1.57-1.21 (2s, 6 H, CMe₂).

^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3): δ 166.2-165.2 (Ph), 133.5-13.8 (BzO), 112.0 (CMe_2), 108.97 (C-2 Fru), 96.2 (C-2 Glu), 79.15 (C-5 Fru), 77.5-76.63 (CH_2Ph), 76.73 (C-4 Fru), 76.14 (C-3 Fru), 71.8 (C-2 Glu), 71.3 (C-1 Fru), 70.6 (C-3 Glu), 69.8 (C-6 Fru), 69.5 (C-4 Glu), 67.9 (C-5 Glu), 62.9 (C-6 Glu), 26.2, 26.0 (CMe_2).

ESI/MS: m/z 1006 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

Anal. Calcd. para $\text{C}_{57}\text{H}_{50}\text{O}_{17}$: C 67.99; H 5.00. Encontrado: C 68.11; H 5.08.

3,4,2',3',4',6'-Hexa-*O*-bencil-1,2-*O*-isopropiliden- β -palatinosa (16). A una disolución de **13** (462 mg, 1.20 mmol) en DMF (3.3 mL), se añadió NaH (60%, 338 mg, 9.72 mmol), y bromuro de bencilo (1.32 mL, 10.87 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente, se añadió MeOH (1.32 mL) y se evaporó el disolvente. La mezcla resultante se extrajo con Et_2O (2x20 mL), se lavó con agua-hielo (2 x 20 mL), se secó (Na_2SO_4), y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (1:6 AcOEt-éter de petróleo). Rend.: 736 mg (66%). R_f = 0.24 (1:6 AcOEt-éter de petróleo); $[\alpha]_D = +14.5$ (c 1.0, DCM).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 7.46-7.11 (m, 30 H, Bn), 4.97 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1 Glu), 4.95-4.98 (m, 12 H, CH_2Ph), 4.28 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 6.1$ Hz, $J_{4,5} = 4.7$ Hz, H-4 Fru), 4.19-4.14 (m, 1 H, H-5 Fru), 4.08, 3.99 (2d, 2 H, $^2J_{\text{H,H}} = 9.4$ Hz, H-1 Fru), 4.07 (d, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, H-3 Fru), 4.04 (t, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 9.2$ Hz, H-3 Glu), 3.92 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 10.3$ Hz, $J_{5,6a} = 5.4$ Hz, H-6a Fru), 3.90-3.85 (m, 1 H, H-5 Glu), 3.79 (dd, H, $J_{6a,6b} = 10.7$ Hz, $J_{5,6a} = 3.5$ Hz, H-6a Glu), 3.74 (t, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 9.1$ Hz, H-4 Glu), 3.70 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 2.1$ Hz, H-6b Glu), 3.66 (dd, 1 H, $J_{3,2} = 9.6$ Hz, H-2 Glu), 3.60 (t, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 9.2$ Hz, H-6b Fru), 1.55, 1.52 (2 s, 6 H, CMe_2).

^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3): δ 138.8-137.7 (Ph), 128.5-127.4 (BnO), 111.6 (CMe_2), 109.0 (C-2 Fru), 97.4 (C-1 Glu), 86.2 (C-4 Fru), 82.8 (C-3 Fru), 82.1 (C-3 Glu),

80.1 (C-2 Glu), 79.9 (C-5 Fru), 77.6 (C-4 Glu), 75.7-72.2 (CH₂Ph), 71.0 (C-1 Fru), 70.4 (C-5 Glu), 69.7 (C-6 Fru), 68.3 (C-6 Glu), 26.7, 26.3 (CMe₂).

ESI/MS: m/z 922 ([M + Na]⁺).

Anal. Calcd para: C₅₇H₆₂O₁₁: C 74.16; H 6.77. Encontrado: C 74.29; H 6.83

1,2:4',6'-Di-O-isopropiliden-β-palatinosa (17). R_f 0.83 (45:10:3 EtOAc-EtOH-H₂O); [α]_D = +32.0 (*c* 1.0, MeOH).

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ (5.02 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 3.7 Hz, H-1 Glu), 4.18-4.11 (2d, 2 H, $^2J_{H,H}$ = 9.9 Hz, H-1 Fru), 4.12 (d, 1 H, $^2J_{H,H}$ = 8.8 Hz, H-3 Fru), 4.07-4 (m, 1 H, H-5 Fru), 4.04 (dd, 1 H, $J_{4,5}$ = 6.3 Hz, $J_{3,4}$ = 8.2 Hz, H-4 Fru), 3.96-3.89 (m, 1 H, H-6a Glu), 3.81 (dd, 1 H, $J_{6a,6b}$ = 10.6 Hz, $J_{5,6a}$ = 3.6 Hz, H-6a Fru), 3.82 (t, 1 H, $^3J_{H,H}$ = 9.3 Hz, H-3 Glu), 3.78-3.71 (m, 1 H, H-5 Glu), 3.74 (dd, 1 H, J_{3-4} = 9.6 Hz, $J_{4,5}$ = 7.4 Hz, H-4 Glu), 3.71 (dd, 1 H, $J_{6a,6b}$ = 10.6 Hz, $J_{5,6b}$ = 2.6 Hz, H-6b Fru), 3.65 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 9.5 Hz, H-2 Glu), 1.57-1.44 (2 d, 12 H, CMe₂).

¹³C RMN (125.5 MHz, D₂O): δ 112.1-108.4 (CMe₂), 100.8 (C-1 Fru), 99.0 (C-1 Glu), 78.9 (C-4 Fru), 75.2 (C-3 Fru), 74.4 (C-5 Fru), 72.9 (C-5 Glu), 72.1 (C-2 Glu), 70.2 (C-3 Glu), 70.0 (C-1 Fru), 69.1 (C-6 Fru), 63.3 (C-4 Glu), 61.6 (C-6 Glu), 27.9-18.4 (CMe₂).

ESI/MS: m/z 422([M + Na]⁺).

Anal. Calcd. para: C₁₈H₃₀O₁₁: C 51.18; H 7.16. Encontrado: C 50.98; H 7.00

3,4,2',3',4',6'-Hexa-O-acetil-1,2-di-O-isopropiliden-β-palatinosa (18). El compuesto 17 (300 mg, 0,75 mmol) se acetiló con piridina y anhídrido acético (1:1)

durante 24 h y se purificó por cromatografía en columna (2:3 EtOAc–éter de petróleo). Rend.: (399 mg, 92%). R_f 0.48 (1:3 EtOAc–éter de petróleo). $[\alpha]_D = +15.7$ (c 1.0, DCM).

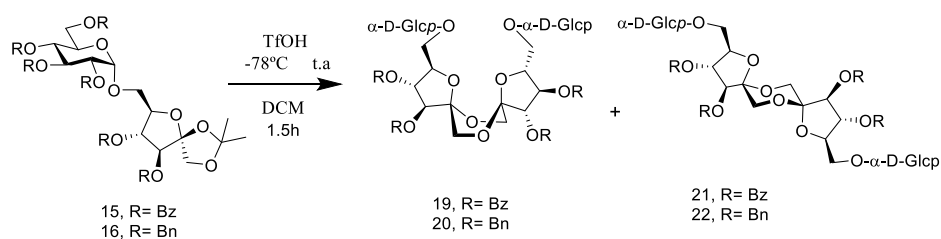
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 5.40 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 6.5$ Hz, $J_{4,5} = 5.2$ Hz, H-4 Fru), 5.36 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.7$ Hz, H-3 Glu), 5.32 (d, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, H-3 Fru), 5.05 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1 Glu), 4.83 (dd, 1 H, H-2 Glu), 4.14-4.08 (m, 1 H, H-5 Fru), 4.11-4.06 (d, 2 H, $^2J_{\text{H,H}} = 9.4$ Hz, H-1 Fru), 3.87 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 10.0$ Hz, $J_{5,6a} = 4.4$ Hz, H-6a Glu), 3.82 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 10.1$ Hz, $J_{5,6a} = 6.5$ Hz, H-6a Fru), 3.80-3.69 (m, 1 H, H-5 Glu), 3.73 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 7.1$ Hz, H-6b Glu), 3.66 (t, 1 H, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, H-4 Glu), 3.64 (dd, H, $J_{6a,6b} = 10.4$ Hz, $J_{5,6b} = 6.4$ Hz, H-6b Fru), 2.12-2.01 (4s, 12 H, Ac), 1.46-1.35 (2d, 2 H, CMe_2).

^{13}C NMR (125.5 MHz, CDCl_3): δ 170.8-170.0 (CO), 112.1-108.8 (CMe_2), 99.9 (C-1 Fru), 96.8 (C-1 Glu), 78.2 (C-5 Fru), 76.6 (C-4 Fru), 75.8 (C-3 Fru), 72.1 (C-4 Glu), 71.5 (C-2 Glu), 71.1 (C-1 Fru), 69.4 (C-3 Glu), 68.9 (C-6 Fru), 63.6 (C-5 Glu), 62.4 (C-6 Glu), 29.1-19.1 (MeCO), 21.0-20.7 (CMe_2).

ESI/MS: m/z 590 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

Anal. Calcd para: $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_{15}$: C 52.88; H 6.49. Encontrado: C 52.95; H 6.53.

7.2.4. Síntesis estereoselectiva de dianhidridos de Palatinosa[®]



A una disolución de **15** (880 mg, 087 mmol) o **16** (530 mg, 0,57 mmol) en DCM (17 o 11 mL) recién destilado a -78 °C se añade bajo Ar ácido triflico (116 o 75 µL, repectivamente). La mezcla de reacción se deja evolucionar hasta alcanzar la temperatura ambiente, se continúa agitando durante 1 h hasta la desaparición del producto de partida, (control con c.c.f). Después se añade Et₃N (0.2 mL) y la mezcla se agita durante 10 min. Los disolventes se eliminan a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna usando como eluyente 1:3 AcOEt-Hex. En el caso del precursor **15** obtuvieron los compuestos **19** y **20** en proporción 22:1 con un rendimiento de 67%, en el caso del derivado **16** se obtuvo una mezcla de los dianhidridos de Palatinosa perbencilados **21** y **22** en proporción 1:19 con un rendimiento de 60%. Los compuestos **19-22** se aislaron puros tras purificación por cromatografía en columna con el disolvente indicado en cada caso.

3,4,3',4'-Tetra-*O*-benzoil-6,6'-bis[2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosil]-di- α -D-fructofuranosa 1,2':2,1'-dianhidrido (19**). $R_f = 0.48$ (1:2 AcOEt-Hex.); $[\alpha]_D = +90.8$ (c 1.0, DCM).**

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.55-7.13 (m, 72 H, BzO), 5.63 (t, 1 H, $^3J_{H,H} = 9.85$ Hz, H-3 Glu), 5.11 (d, 1 H, $^3J_{H,H} = 2.4$ Hz, H-3 Fru), 5.12 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 5.8$ Hz, $J_{4,5} = 2.4$ Hz, H-4 Glu), 4.93 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 2.59$ Hz, $J_{4,5} = 5.90$ Hz, H-4 Fru), 4.78 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1 Fru), 4.72 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 3.69$, $J_{4,5} = 10.08$ Hz, H-2 Glu), 4.07-3.99 (m, 1 H, $J_{5,6a} = 2.6$ Hz, H-5 Glu), 3.99 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H-6a Glu), 3.84 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.2$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H-6b Glu), 3.71-6.65 (m, 1 H, H-5 Fru), 3.45 (dd, 1 H, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.0$ Hz, H-6a Fru), 3.28 (d, 1 H, $J_{H,H} = 12.5$ Hz, H-1a Fru), 3.25 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 2.6$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.1$ Hz, H-6b Fru), 3.11 (d, 1 H, $J_{H,H} = 12.5$ Hz, H-1 Fru).

^{13}C RMN (100.5 MHz, CDCl_3): δ 133.7- 127.6 (Ph), 103.3 (C-2 Fru), 96.4 (C-1 Glu), 80.3 (C-3 Fru), 80.2 (C-5 Fru), 77.6 (C-4 Fru), 71.9 (C-2 Glu), 70.6 (C-3 Glu), 69.3 (C-4 Glu), 68.0 (C-5 Glu), 67.6 (C-6 Fru), 62.8 (C-4 Glu), 61.0 (C-1 Fru).

ESI/MS: m/z 1920 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

Anal. Calcd Para: $\text{C}_{108}\text{H}_{88}\text{O}_{32}$: C 68.35; H 4.67. Encontrado: C 68.36; H 4.82.

3,4-Di-*O*-benzoil-6-[2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosil]- α -D-fructofuranosa 3,4-di-*O*-benzoil-6-[2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosil]- β -D-fructofuranosa 1,2':2,1'-dianhidrido (20). R_f = 0.51 (1:2 AcOEt-Hex); $[\alpha]_D$ = + 42.6 (c 1.0, DCM).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 8.13-7.15 (m, 72 H, BzO), 6.21 (t, H, $^3J_{\text{H,H}}$ = 9.8 Hz, H-3 Glu), 6.15 (t, H, $^3J_{\text{H,H}}$ = 9.2 Hz, H-3 Glu'), 5.78 (dd, H, $J_{3,4}$ = 5.7 Hz, $J_{4,5}$ = 4.9 Hz, H-4 β Fru), 5.72 (t, H, $^3J_{\text{H,H}}$ = 9.8 Hz, H-4 Glu), 5.71 (d, H, $J_{\text{H,H}}$ = 1.7 Hz, H-3 α Fru), 5.64 (t, H, $^3J_{\text{H,H}}$ = 9.8 Hz, H-4 Glu'), 5.56 (dd, H, $J_{4,5}$ = 5.8 Hz, $J_{3,4}$ = 1.7 Hz, H-4 α Fru), 5.53 (d, H, $J_{\text{H,H}}$ = 5.7 Hz, H-3 β Fru), 5.42 (d, H, $J_{\text{H,H}}$ = 2.2 Hz, H-1 Glu), 5.41 (d, H, $J_{\text{H,H}}$ = 2.1 Hz, H-1 Glu') 5.34 (dd, H, $J_{3,2}$ = 10.2 Hz, $J_{1,2}$ = 3.6 Hz, H-2 Gluc), 5.18 (dd, H, $J_{3,2}$ = 10.2 Hz, $J_{1,2}$ = 3.7 Hz, H-2 Glu'), 4.65-4.57 (m, H, H-5 Glu, H-6 Glu, H-5 Glu, H-6 Glu'), 4.55 (dd, H, $J_{5,6}$ = 10.8 Hz, $J_{4,5}$ = 4.9 Hz, H-5 β Fru), 4.46 (dd, H, $J_{6a,6b}$ = 11.7 Hz, $J_{5,6b}$ = 4.5 Hz, H-6b Glu), 4.45 (dd, H, $J_{6a,6b}$ = 12.2 Hz, $J_{5,6b}$ = 5.2 Hz, H-6b Glu'), 4.36 (dd, H, $J_{4,5}$ = 5.8 Hz, $J_{5,6}$ = 3.7 Hz, H-5 α Fru), 4.14 (dd, H, $J_{6a,6b}$ = 11.5 Hz, $J_{5,6a}$ = 4.4 Hz, H-6a α Fru), 4.07 (dd, H, $J_{6a,6b}$ = 10.8 Hz, $J_{5,6a}$ = 5.5 Hz, H-6 β Fru), 3.74, 3.32 (2d, 2H, $^2J_{\text{H,H}}$ = 11.9 Hz, H-1 α Fru), 4.02 (dd, H, $J_{6a,6b}$ = 10.8 Hz, $J_{5,6a}$ = 6.9 Hz, H-6b β Fru), 4.17, 3.54 (2d, 2H, $^2J_{\text{H,H}}$ = 11.9 Hz, H-1 β Fru), 3.86 (dd, H, $J_{6a,6b}$ = 11.5 Hz, $J_{5,6a}$ = 3.1 Hz, H-6b α Fru').

¹³C RMN (100.5 MHz, CDCl₃): δ 166.60-165.00 (C=O), 134.00-128.50 (Ph), 102.39 (C-2 Fru), 100.44 (C-2 Fru'), 97.33 (C-1 Glc ó Glc'), 97.15 (C-1 Glc' ó Glc), 82.38 (C-4 Fru), 81.27 (C-5 Fru), 80.30 (C-5 Fru'), 74.68 (C-4 Fru'), 77.57 (C-3 Fru), 76.67 (C-3 Fru'), 72.13 (C-2 Glc, C-2 Glc'), 71.36 (C-6 Fru'), 70.95 (C-3 Glc'), 70.83 (C-3 Glc), 69.57 (C-4 Glc, C-4 Glc'), 68.64 (C-5 Glc ó C-5 Glc'), 68.53 (C-5 Glc ó C-5 Glc'), 68.45 (C-6 Fru), 63.28 (C-1 Fru'), 62.96 (C-6 Glc, C-6 Glc'), 62.17 (C-1 Fru).

ESI/MS: m/z 1920 ([M + Na]⁺).

Anal. Calcd Para: C₁₀₈H₈₈O₃₂: C 68.35; H 4.67. Encontrado: C 68.36; H 4.82.

3,4,3',4'-Tetra-*O*-bencil-6,6'-bis[2,3,4,6-tetra-*O*-bencil- α -D-glucopiranosil]-di- α -D-fructofuranosa 1,2':2,1'-dianhidrido (21). R_f = 0.51 (AcOEt-Hex, 1:2); $[\alpha]_D$ = +85.4 (*c* 1.0, CH₂Cl₂).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.30-7.08 (m, 60H, BnO), 4.91 (m, 24H, CH₂Ph), 4.83 (d, H, $J_{H,H}$ = 3.5 Hz, H-1 Glc), 4.21-4.15 (m, H, H-5 Fru), 4.05 (d, H, $J_{H,H}$ = 12.8 Hz, H-1a Fru), 4.02 (d, H, $J_{H,H}$ = 3.7 Hz, H-3 Fru), 3.77 (d, H, $J_{H,H}$ = 9.2 Hz, H-3 Glc), 3.90 (dd, H, $J_{4,5}$ = 6.6 Hz, $J_{3,4}$ = 3.7 Hz, H-4 Fru), 3.77-3.71 (m, H, H-5 Glc), 3.76 (d, H, $J_{H,H}$ = 12.8 Hz, H-1a Fru), 3.74 (dd, H, $J_{6a,6b}$ = 11.5 Hz, $J_{5,6a}$ = 4.7 Hz, H-6a Fru), 3.78 (m, H, H-4 Glc), 3.77, 3.76 (dd, H, $J_{6a,6b}$ = 11.0 Hz, $J_{5,6a}$ = 4.87 Hz, H-6a Glc, H-6b Glc), 3.68 (dd, H, $J_{6a,6b}$ = 11.0 Hz, $J_{5,6b}$ = 4.38 Hz, H-6b Fru), 3.66 (dd, H, $J_{3,2}$ = 9.5 Hz, $J_{1,2}$ = 3.7 Hz, H-2 Glc).

¹³C RMN (125.5 MHz, CDCl₃): δ 138.8-137.7 (Ph), 128.5-127.4 (BnO), 105.5 C-2 Fru), 97.4 (C-1 Glc), 75.7—72.0 (CH₂Ph), 88.1 (C-3 Fru), 83.8 (C-4 Fru), 81.9 (C-3 Glc), 80.1 (C-2 Glc), 78.8 (C-5 Fru), 77.6 (C-4 Glc), 70.4 (C-5 Glc), 68.4 (C-6 Glc), 67.4 (C-6 Fru), 60.0 (C-1 Fru).

ESI/MS: m/z 1729 ([M + Na]⁺).

Anal. Calcd Para: C₁₀₈H₁₁₂O₂₀: C 74.98; H 6.53. Encontrado: C 75.06; H 6.60

3,4-Di-*O*-bencil-6-[2,3,4,6-tetra-*O*-bencil- α -D-glucopiranosil]- α -D-fructofuranosa 3,4-di-*O*-bencil-6-[2,3,4,6-tetra-*O*-bencil- α -D-glucopiranosil]- β -D-fructofuranosa 1,2':2,1'-dianhidrido (22). $R_f = 0.39$ (AcOEt-Hex, 1:3); $[\alpha]_D = +42.6$ (c 1.0, CH₂Cl₂).

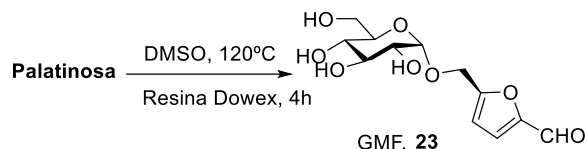
¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.34-7.08 (m, 72 H, BnO), 4.90 (d, H, $J_{H,H} = 3.2$ Hz, H-1 α Glc), 4.87 (d, H, $J_{H,H} = 3.5$ Hz, H-1 α Glc'), 4.86-4.32 (m, H, CH₂Ph), 4.28 (dd, H, $J_{4,5} = 6.0$ Hz, $J_{3,4} = 4.3$ Hz, H-4 Fru), 4.25 (dd, H, $J_{4,5} = 10.8$ Hz, $J_{3,4} = 5.1$ Hz, H-4 Fru'), 4.19-4.13 (m, H, H-5 Fru), 4.13, 4.39 (2d, 2H, $^2J_{H,H} = 11.8$ Hz, H-1 Fru), 4.10, 3.83 (2d, 2H, $^2J_{H,H} = 12.3$ Hz, H-1 Fru'), 3.97 (t, H, $^3J_{H,H} = 9.3$ Hz, H-3 Glc'), 3.95 (t, H, $^3J_{H,H} = 9.2$ Hz, H-3 Glc), 3.97 (t, H, $^2J_{H,H} = 1.5$ Hz, H-3 Fru), 3.95 (dd, H, $J_{6a,6b} = 4.4$ Hz, $J_{5,6a} = 2.0$ Hz, H-6a Fru'), 3.92 (dd, H, $J_{6a,6b} = 10.6$ Hz, $J_{5,6a} = 4.4$ Hz, H-6b Fru'), 3.91 (dd, H, $J_{5,6a} = 5.9$ Hz, $J_{6a,6b} = 4.7$ Hz, H-6a Fru), 3.83 (m, H, H-5 Glc), 3.81 (m, H, H-5 Glc'), 3.78 (d, H, $^2J_{H,H} = 6$ Hz, H-3 Fru), 3.74-3.68 (m, 2H, H-4 Glc, H-4 Glc'), 3.72-3.63 (m, H, H-6 Glc, H-6 Glc'), 3.62 (dd, H, $J_{3,2} = 9.3$ Hz, $J_{1,2} = 3.32$ Hz, H-2 Glc), 3.6 (dd, H, $J_{3,2} = 9.3$ Hz, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-2 Glc'), 3.62-3.57 (m, H, H-5 Fru'), 3.50 (t, H, $^3J_{H,H} = 9.2$ Hz, H-6b Fru).

¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 139.36-137.68, 129.00-127.63 (Ph), 103.00 (C-2 Fru), 100.11 (C-2 Fru'), 98.20 (C-1 Glc'), 97.79 C-1 Glc), 88.68 (C-3 Fru'), 87.19 (C-4 Fru), 85.06 (C-6 Fru'), 84.20 (C-3 Fru), 82.42 (C-3 Glc o Glc'), 82.35 (C-3 Glc o Glc'), 81.91 (C-4 Fru'), 80.55 (C-5 Fru), 80.46 (C-2 Glc o Glc'), 80.42 (C-2 Glc o Glc'), 77.93 (C-4 Glc o Glc'), 77.76 (C-4 Glc o Glc'), 76.03-72.12 (-CH₂-Ph), 70.84 (C-5 Glc o Glc'), 70.74 (C-5 Glc o Glc'), 69.72 (C-6 Fru), 69.05 (C-5 Fru'), 68.74 (C-6 Glc o Glc'), 68.60 (C-6 Glc o Glc'), 63.49 (C-1 Fru), 62.93 (C-1 Fru').

ESI/MS: m/z 1752 ([M + Na]⁺).

Anal. Calcd Para $C_{108}H_{112}O_{20}$: C 74.98; H 6.53. Encontrado: C 75.06; H 6.60.

7.2.5. *Preparación de 5- α -D-glucopiranosiloximetilfurfural (G-HMF, 23)*



Una disolución de Palatinosa[®] (3 g, 8.76 mmol) en DMSO (30 mL), en presencia de resina acida Dowex[®] (0.333 g) se calentó a 120 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se filtró y se concentró en el rotavapor. El producto se purificó por cromatografía en columna de sílice (45:5:3 EtOAc-EtOH- H₂O). Rend.: 1.61 g (67%). Los datos físicos coinciden con los descritos en la bibliografía.¹¹

7.2.6. *Reacciones de caramelización de Palatinosa[®] empleando catalizadores heterogéneos*

La palatinosa[®] (3-10 g) se disuelve en 50-100 mL de agua mediante calentamiento en baño de silicona a 80-90 °C. A continuación se añade el catalizador y se cierra el matraz con un septum, agitando la mezcla de reacción. La temperatura, la proporción de catalizador y el tiempo de reacción de cada experimento se indican en la tabla 7.4. Para detener la reacción de caramelización se añade una mezcla agua-hielo (50 mL), se filtran las muestras para separar el catalizador y se lava varias veces con agua para recuperar los restos de caramelo adherido al mismo. Para los estudios de cinética de caramelización se extrajeron alícuotas (50-100 mg) a determinados intervalos de tiempo y se conservaron en frío para su posterior derivatización y análisis.

Tabla 7.4. Condiciones de caramelización de Palatinosa® con diferentes catalizadores (escala 5-10 g).

Exp No.	Catalizador	Azúcar ^a (%)	Catalizador ^b (%)	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Conversión (%)
1	Lewatit S2328	80	20	90	2	90
2	Lewatit S2328	90	20	90	2	99
3	Lewatit S2328	90	10	90	2	95
4	Zeolita FAU56	90	20	90	72	69
5	Zeolita FAU-56	90	10	90	6	58
6	Zeolita FAU-25	90	20	90	8	53
7	Zeolita FAU-25	90	10	90	8	35
8	Zeolita FAU-15	90	20	90	8	41
9	Zeolita FAU-15	90	10	90	8	31
10	H ₂ SO ₄ ·SiO ₂	80	10	80	2	83
11	H ₃ PO ₄ ·SiO ₂	80	10	80	30	62

^a. Porcentaje en peso en la disolución acuosa. ^b porcentaje relativo al peso de Palatinosa®

7.2.7. Reacciones de caramelización de D-fructosa y D-glucosa empleando catalizadores heterogéneos

Las condiciones de caramelización utilizadas dependieron de la escala de trabajo.

Escala 3-10 g: Se han empleado las condiciones de concentración de azúcar, proporción de catalizador, tiempo y temperatura que se indican en la Tabla 7.5a y 7.5b, utilizando los catalizadores heterogéneos previamente acondicionados (resina, y sílica). Las reacciones se llevaron a cabo en un matraz de fondo redondo de 50-100 mL cerrado con un septum e inmerso en un baño de aceite de silicona. Para detener la reacción de caramelización se añade una mezcla agua-hielo (50 mL), posteriormente, se filtran las muestras para separar el catalizador y se lava varias veces con agua para recuperar los restos de caramelo adherido al mismo.

Escala 300-400 g: Se llevaron a cabo las reacciones de caramelización en un reactor de laboratorio IKA LR2 ST versión 3. El azúcar se disuelve previamente en agua a la concentración requerida mediante calentamiento. Posteriormente, se añade el catalizador heterogéneo, y se continúa calentando con una buena agitación. Las condiciones de concentración de azúcar, proporción de catalizador, tiempo y temperatura se recojen la Tabla 7.3a y 7.3b. Para detener la reacción de caramelización se añade una mezcla agua-hielo (500-750 mL), se filtran las muestras para separar el catalizador y se lava varias veces con agua para recuperar restos de caramelo adherido al mismo. Para los estudios de cinética de caramelización se extrajeron alícuotas (50-100 mg) a determinados intervalos de tiempo y se conservaron en frío para su posterior derivatización y análisis.

Tabla 7.5a. Condiciones de caramelización de D-fructosa con diferentes catalizadores heterogéneos (Escala pequeña 5-10 y escala superior 300-400 g).

Exp. No.	Catalizador	Azúcar ^a (%)	Catalizador ^b (%)	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Conversión (%)	Escala ^c
1	H ₂ SO ₄ ·SiO ₂	80	10	80	2	90	M
2	H ₂ SO ₄ ·SiO ₂	90	5	90	3	96	M
3	H ₂ SO ₄ ·SiO ₂	90	10	90	3	98	M
4	H ₂ SO ₄ ·SiO ₂	90	20	90	1,5	97	M
5	H ₃ PO ₄ ·SiO ₂	80	10	80	29,5	77	M
6	H ₃ PO ₄ ·SiO ₂	90	10	90	3	69	M
7	H ₃ PO ₄ ·SiO ₂	90	20	90	3	70	M
8	Lewatit S2328	80	10	80	2	74	M
9	H ₂ SO ₄ ·SiO ₂	90	1	90	2	78	R
10	H ₂ SO ₄ ·SiO ₂	90	2	90	2	85	R
11	H ₃ PO ₄ ·SiO ₂	90	10	90	3	51	R
12	H ₃ PO ₄ ·SiO ₂	90	10	90	4	65	R

^a. Porcentaje en peso en la disolución acuosa. ^b Porcentaje relativo al peso de D-fructosa. ^c M indica matraz y R, reactor.

Tabla 0.5b. Condiciones de caramelización de D-glucosa con diferentes catalizadores heterogéneos (Escala pequeña 5-10 y escala superior 300-400 g).

Exp. No	Catalizador	Azúcar ^a (%)	Catalizador ^b (%)	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Conversión (%)	Escala ^c
1	H ₂ SO ₄ ·SiO ₂	83	5	90	3	83	M
2	H ₂ SO ₄ ·SiO ₂	83	10	90	3	84	M
3	H ₂ SO ₄ ·SiO ₂	83	20	90	3	88	M
4	H ₃ PO ₄ ·SiO ₂	83	10	90	34	66	M
5	H ₃ PO ₄ ·SiO ₂	83	20	90	5	78	M
6	H ₂ SO ₄ ·SiO ₂	83	2	90	3	66	R
7	H ₃ PO ₄ ·SiO ₂	83	10	90	33	55	R
8	Lewatit S2328	83	10	90	4	63	R

^a. Porcentaje en peso en la disolución acuosa. ^b Porcentaje relativo al peso de D-glucosa. ^c M indica matraz y R, reactor.

7.2.8. *Reacciones de caramelización de D-manosa empleando resina Lewatit S2328 (H)⁺ o sílicas ácidas H₂SO₄·SiO₂ (SAS) y H₃PO₄·SiO₂ (SAF)*

La D-manosa (3 g) se disuelve en agua (80 y 90% en peso) mediante calentamiento en baño de silicona a 90 °C. A continuación se añade la resina Lewatit S2328, sílicas ácida SAS y SAF 10% en peso relativo a la D-manosa y se cierra el matraz con un septum, agitando la mezcla de reacción, durante 3-4 h. Para detener la reacción de caramelización se añade una mezcla agua-hielo (50 mL), se filtran las muestras para separar el catalizador y se lava varias veces con agua para recuperar los restos de caramelo adherido al mismo. Para los estudios de cinética de caramelización se extrajeron alícuotas (50-100 mg) a determinados intervalos de tiempo y se conservaron en frío para su posterior derivatización y análisis. Las condiciones de reacción y las conversiones alcanzadas se recojen la Tabla 7.6.

Tabla 0.6. Condiciones de caramelización de D-manosa con diferentes catalizadores heterogéneos (Escala pequeña 5-10 g).

Exp. No	Catalizador	Azúcar ^a (%)	Catalizador ^b (%)	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Conversión (%)
1	Lewatit S2328	80	10	90	4	65
2	Lewatit S2328	90	10	90	4	66
3	H ₂ SO ₄ ·SiO ₂	80	10	90	3	77
4	H ₂ SO ₄ ·SiO ₂	90	10	90	3	90
5	H ₃ PO ₄ ·SiO ₂	80	10	90	4	33
6	H ₃ PO ₄ ·SiO ₂	90	10	90	4	41

^a. Porcentaje en peso en la disolución acuosa. ^b porcentaje relativo al peso de D-fructosa ^c M indica matraz y R, reactor.

7.2.9. Reacciones de caramelización de D-fructosa empleando CO₂ o CO₂ y ácido cítrico como catalizadores

Una disolución al 85% (peso/volumen) de fructosa (6-30 g) en agua se introdujo en un reactor de acero inoxidable y se inyectó dióxido de carbono gas hasta alcanzar la presión requerida (1-20 bares). En algunos de los ensayos se incorporó ácido cítrico (5-10% en peso relativo a la fructosa) como cocatalizador. La mezcla homogénea se calentó a una temperatura de 90 o 100 °C durante 2-48 h bajo agitación magnética constante. Posteriormente, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se despresurizó el reactor hasta presión atmosférica. Las condiciones de reacción y las conversiones alcanzadas se recogen en la Tabla 7.7.

El análisis del caramelo mediante cromatografía de gases utilizando fenil α -D-glucopiranosido como estándar interno. Para los estudios de cinética de caramelización se extrajeron alícuotas (50-100 mg) a determinados intervalos de tiempo y se conservaron en frío para su posterior derivatización y análisis

Tabla 0.7. Condiciones de caramelización de D-fructosa empleando CO₂ como catalizador.

Exp No.	Fructosa (g)	Acido cítrico (g)	Presión CO ₂ (bar)	Tempo (°C)	Tiempo (h)	Conversión
1	30	0	20	90	2	17
2	30	0	20	90	10	24
3	30	0	20	90	24	35
4	30	0	20	90	72	61
5	30	0	1,2	90	72	63
5	30	0	20	100	48	72
6	180	0	20	100	48	69
8	30	0	N ₂	100	48	64
9	30	1,5	20	90	12	62
10	30	3,0	20	90	12	69

7.2.10. Reacciones de caramelización de Palatinosa[®] empleando CO₂ como catalizador

Una disolución de Palatinosa al 85% (peso/volumen) (30 g) en agua se introdujo en un reactor de acero inoxidable y se inyectó dióxido de carbono gas hasta alcanzar la presión requerida de 20 bares. La mezcla homogénea se calentó a una temperatura de 90 o 110 °C durane 24 o 72 h bajo agitación magnética constante. Posteriormente, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se despresurizó el reactor hasta presión atmosférica. Las condiciones de reacción y las conversiones alcanzadas se recojen la Tabla 7.8.

Tabla 0.8. Condiciones de caramelización de Palatinosa® (85% p/v) empleando CO₂ (20 bar) como catalizador.

Exp No.	Palatinosa (g)	Presión CO ₂ (bar)	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Conversión (%)
1	30	20	90	24	54
2	30	20	90	72	70
3	30	20	110	24	84

El análisis del caramelo obtenido se lleva a cabo mediante cromatografía de gases utilizando fenil α -D-glucopiranosido como estándar interno, siguiendo el protocolo descrito. Para los estudios de cinética de caramelización se extrajeron alícuotas (50-100 mg) a determinados intervalos de tiempo y se conservaron en frío para su posterior derivatización y análisis.

7.2.11. Reacciones de caramelización de Palatinosa® empleando catalizadores heterogéneos y activación mediante irradiación por microondas.

La Palatinosa® (1 g) se disuelve en 250 μ L de agua mediante calentamiento en baño de silicona a 60 °C. A continuación se añade el catalizador (0.1 g) y se sella el tubo de reacción. La mezcla de reacción se irradió a 100 o 200 W, empleando un horno de microondas (Biotge initiator™ 2.0). La proporción de catalizador, la potencia empleada y el grado de conversión de cada experimento se indican en la tabla 7.9. Para detener la reacción de caramelización se añade una mezcla agua-hielo (5 mL), se filtran las muestras para separar el catalizador y se lava varias veces con agua para recuperar los restos de caramelo adherido al mismo. Para los estudios de cinética de caramelización se extrajeron alícuotas (20 mg) a determinados intervalos de tiempo y se conservaron en frío para su posterior derivatización y análisis.

Tabla 0.9. Condiciones de caramelización de Palatinosa® empleando resina Lewatit S2328 (H⁺) y activación mediante irradiación por microondas.

Exp No.	Catalizador	Azúcar ^a (%)	Catalizador (%)	Potencia (W)	Tiempo (min)	Conversión (%)
1	Lewatit S2328	80	10	100	180	89
2	Lewatit S2328	80	10	200	180	92
3	Silica ácida	80	10	200	60	91

^a. Porcentaje en peso en la disolución acuosa. b porcentaje relativo al peso de Palatinosa®

7.2.12. Reacciones de caramelización de Palatinosa® con ácido cítrico a presión reducida.

La Palatinosa® (5 g) se disuelve en 1.5mL de agua desionizada, mediante calentamiento en el rotavapor a 105 °C se añade el ácido cítrico (0,15-3g) hasta disolver y se concentró a presión reducida durante 30 min a 105°C. Para detener la reacción de caramelización se añade una mezcla agua-hielo (5 mL), se filtran las muestras para separar el catalizador y se lava varias veces con agua para recuperar los restos de caramelo adherido al mismo. Se extrajo una alícuota (20 mg) de la muestra y se conservó en frío para su posterior derivatización y análisis.

Bibliografía

1. Ruiz-Matute, A. I.; Hernández-Hernández, O.; Rodríguez-Sánchez, S.; Sanz, M. L.; Martínez-Castro, I., *J. Chromatog. B*, **2011**, 879, 1226-1240.
2. Ratsimba, V.; Garcia Fernández, J. M.; Defaye, J.; Nigay, H.; Voilley, A., *J. Chromatogr. A.*, **1999**, 844, 283-293.
3. Curtius, H. C.; Müller, M.; Völlmin, J. A., *J. Chromatogr. A.*, **1968**, 37, 216-224.
4. Zhang, W.; He, H.; Zhang, X., *Soil Biol. Biochem.*, **2007**, 39, 2665-2669.
5. Ciucanu, I.; Costello, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 16213-16219.
6. Kim, J. S.; Reuhs, B. L.; Michon, F.; Kaiser, R. E.; Arumugham, R. G., *Carbohydr. Res.*, **2006**, 341, 1061-1064.
7. Sasaki, G. L.; Gorin, P. A. J.; Souza, L. M.; Czelusniak, P. A.; Iacomini, M., *Carbohydr. Res.*, **2005**, 340, 731-739.
8. Maleki, B., *Inter J. Org. Chem.*, **2012**, 02, 93-99.
9. Sawant, A. D.; Raut, D. G.; Deorukhkar, A. R.; Desai, U. V.; Salunkhe, M. M., *Green Chemistry Letters and Reviews*, **2011**, 4, 235-240.
10. Defaye, J.; Garcia Fernández, J. M., *Carbohydr. Res.*, **1992**, 273, 223-247.
11. Lichtenthaler, F. W.; Martin, D.; Weber, T.; Schiweck, H., *Liebigs Annalen der Chemie*, **1993**, 967-974.